



**ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA**  
**CURSO DE MEDICINA**

**HANNA LOUISE DE ALMEIDA LISBOA**

**AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO FECAL DE**  
***Bifidobacterium* spp. E ÁCIDOS GRAXOS PLASMÁTICOS EM CRIANÇAS DO**  
**SERTÃO DA BAHIA**

**SALVADOR**

**2023**

**HANNA LOUISE DE ALMEIDA LISBOA**

**AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO FECAL DE  
*Bifidobacterium* spp. E ÁCIDOS GRAXOS PLASMÁTICOS EM CRIANÇAS DO  
SERTÃO DA BAHIA**

Trabalho de conclusão de cursos,  
apresentado ao Curso de Graduação em  
Medicina da Escola Bahiana de Medicina e  
Saúde Pública, para aprovação parcial no 4º  
ano de medicina

Orientador(a): ANA MARICE TEIXEIRA  
LADEIA

Co-orientador(a): JESSICA MIRELLA DE  
SOUZA GOMES

**SALVADOR**

**2023**

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de, primeiramente, trazer agradecimentos à minha família, pai, mãe, irmão e avós, Sandra e Lacrose, meu namorado e meus amigos que me apoiaram nos momentos mais difíceis dessa fase, foram fortaleza nos momentos de incerteza e minha garantia de que daria tudo certo ao final, obrigada por serem tudo, por torcerem comigo e vibrarem de felicidade com cada conquista, isso tudo é por vocês.

Agradeço também a minha orientadora Dra. Ana Ladeia que estava sempre disponível para me auxiliar brilhantemente, trazendo esperança, força, calma e muito conhecimento para esse momento tão importante da minha vida acadêmica, obrigada pelo carinho e atenção sempre, tive muita sorte em ser sua orientanda.

Sou extremamente grata a Jéssica Gomes, Supervisora do Núcleo de Pesquisa e Inovação da Escola Bahiana (NUPI) e minha co-orientadora, obrigada por ter passado dias inteiros comigo no laboratório, por ter se dedicado de corpo e alma a esse trabalho, assim como eu e por ter segurado minha mão durante toda essa jornada, você é força e calma, sem você não teria chegado até aqui.

Agradeço a Vanessa e Beatrice que me ofertaram seus bancos de dados, para, adicionados ao meu, serem analisados nesse estudo, vocês fazem parte disso tanto quanto eu. Sou muito grata a Dra. Camilla Almeida Menezes que fez importante contribuição no presente estudo, me ofertando seu banco de dados da concentração fecal de Bifidobactérias, parte chave desse projeto, sem você nada disso seria possível, obrigada pelo apoio e por ter dividido essa parte tão importante do seu trabalho comigo.

Gostaria também de agradecer à instituição Escola Bahiana de Medicina e saúde pública e o NUPI por terem me disponibilizado os meios para dar continuidade ao trabalho, me ofertando os substratos para coleta e o local de análise dos dados, vocês foram essenciais no sucesso desse estudo.

## RESUMO

**Introdução:** A microbiota intestinal está relacionada a múltiplos efeitos metabólicos presentes no corpo humano, regulando as mais diversas cascatas de sinalização e influenciando no bem-estar e processo de saúde e doença. Ela é composta por diversos gêneros bacterianos, mas o que possui relações mais relevantes com o processo de saúde e adoecimento é o *Bifidobacterium* spp. (BIF). Os processos metabólicos regulados por essas bactérias sofrem influência do metabolismo de carboidratos não digeríveis que são fermentados no trato gastrointestinal, dando origem aos ácidos graxos, que juntamente com a microbiota, atuam modulando diversos processos como: regulação inflamatória, controle hormonal, produção de vitaminas, resistência insulínica e outros, tais quais possuem grande relevância clínica para os pacientes e são modificadores de desfecho, tornando a regulação da microbiota intestinal um provável alvo terapêutico futuro. **Objetivo:** analisar os dados coletados e descrever a relação entre a dosagem sérica de ácidos graxos (FAs) e concentração fecal de *Bifidobacterium* spp.. **Métodos:** 59 indivíduos, de 5 a 19 anos, sem diagnóstico prévio de doenças que possam interferir em seu estado nutricional, matriculados nos diversos níveis educacionais em escolas municipais em zona rural e urbana de quatro municípios do Sertão da Bahia, avaliados no início do ano letivo de 2019, sendo colhidas amostras de sangue (hemo e soro) e amostras fecais. A avaliação da abundância fecal de BIF foi feita pelo método de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. A análise do perfil de ácidos graxos séricos foi realizada por cromatografia gasosa. **Resultados:** maiores níveis dos ácidos graxos palmitoleico, linoleico e linolênico + oleico estão associados a maiores concentrações fecais de bifidobactérias, sendo observada melhora do padrão de ácidos graxos cardioprotetores com aumento da concentração fecal de BIF. **Conclusão:** os resultados comprovam a relação entre os ácidos graxos plasmáticos de cadeia média e longa e a concentração fecal de bifidobactérias, tornando ambos possíveis alvos terapêuticos para diversos distúrbios sistêmicos, principalmente no âmbito cardiovascular e metabólico.

**Palavras-chave:** Microbiota intestinal. Bifidobactérias. *Bifidobacterium* spp.. Ácidos graxos.

## ABSTRACT

**Introduction:** The intestinal microbiota is related to multiple metabolic effects present in the human body, regulating the most diverse signaling cascades and influencing well-being and the health and disease process. It is composed of several bacterial genera, but the one that has the most relevant correlation with the health and illness process is *Bifidobacterium* spp. (BIF). The metabolic processes regulated by these bacteria are influenced by the metabolism of non-digestible carbohydrates that are fermented in the gastrointestinal tract, giving rise to fatty acids, which associated with the microbiota, act modulating several processes such as: inflammatory regulation, hormonal control, vitamin production, insulin resistance and others, which have great clinical relevance for patients and are outcome modifiers, making the regulation of the intestinal microbiota a likely future therapeutic target. **Objective:** analyze the collected specimens and describe the correlation between serum levels of fatty acids (FAs) and fecal concentration of *Bifidobacterium* spp.. **Methods:** 59 individuals, aged 5 to 19 years, without prior diagnosis of diseases that may interfere with their nutritional status, enrolled in different educational levels in municipal schools in rural and urban areas of four municipalities in the Sertão of Bahia, evaluated at the beginning of the 2019 school year, with blood specimens (hemo and serum) and fecal specimens being collected. The assessment of fecal BIF abundance was carried out using the Real-Time Polymerase Chain Reaction method. Analysis of the serum fatty acid profile was performed by gas chromatography. **Results:** higher levels of palmitoleic, linoleic and linolenic + oleic fatty acids are associated with higher fecal concentrations of bifidobacteria, with improvements in the pattern of cardioprotective fatty acids being observed with an increase in the fecal concentration of BIF. **Conclusion:** the results validate the correlation between plasma medium and long chain fatty acids and the fecal concentration of bifidobacteria, becoming them two possible therapeutic targets for several systemic disorders, mainly in the cardiovascular and metabolic spheres.

**Key- words:** Intestinal microbiome. Bifidobacteria. *Bifidobacterium* spp.. Fatty acids.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>9</b>
3.1	Objetivo primário	9
3.2	Objetivo secundário	9
<b>4</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>9</b>
4.1	Microbiota intestinal	9
4.2	<i>Bifidobacterium</i> spp.	11
4.3	Ácidos Graxos	13
4.4	Impacto da microbiota sobre a concentração de ácidos graxos	19
<b>5</b>	<b>MÉTODOS</b>	<b>20</b>
5.1	Desenho do estudo	20
5.2	População acessível	20
5.3	Critérios de inclusão	21
5.4	Critérios de exclusão	21
5.5	Variáveis	21
5.6	Coleta de dados	21
5.7	Determinação dos ácidos graxos	23
5.8	Análise da microbiota	24
5.9	Aspectos éticos	26
<b>6</b>	<b>AMOSTRA</b>	<b>26</b>
6.1	Tipo	27
6.2	Fonte dos dados	27
6.3	Cálculo amostral	27
<b>7</b>	<b>PLANO DE ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	<b>27</b>
<b>8</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>28</b>
<b>9</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>31</b>
<b>10</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>36</b>
<b>11</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>36</b>
<b>12</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>46</b>
12.1	Anexo A – Ficha de avaliação clínica padrão	46
12.2	Anexo B – Parecer consubstanciado do CEP	47

## 1 INTRODUÇÃO

Os seres humanos não possuem enzimas para degradar a maior parte das fibras alimentares. Portanto, esses carboidratos não digestíveis passam pelo trato gastrointestinal superior sem serem afetados e são fermentados no ceco e no intestino grosso pela microbiota cecal e colônica anaeróbia, principalmente dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* spp. A fermentação resulta em vários grupos de metabólitos dos quais os ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs, short chain fatty acids) são os principais. Para a comunidade microbiana, os SCFAs são um produto residual necessário, para o ambiente anaeróbio do intestino.<sup>1</sup>

Além disso, a ingestão de alimentos, principalmente de origem animal, óleo de coco e azeites geram disponibilidade intestinal e sérica de ácidos graxos saturados (SFAs), Monoinsaturados (MUFAs) e Poliinsaturados (PUFAs), que tem importância na abundância de certos gêneros bacterianos da microbiota e em efeitos cardiovasculares.<sup>2,3</sup> Poucos são os estudos que relacionam a microbiota intestinal e outros ácidos graxos além dos SCFAs, já tendo sido relatada e a influência na microbiota intestinal na formação do ácido linoleico conjugado e outros PUFAs e MUFAs, principalmente quando falamos sobre a biodisponibilidade dos mesmos.<sup>4,5</sup>

Nas últimas décadas, ficou evidente que os SCFAs e outros ácidos graxos podem desempenhar um papel fundamental na prevenção e tratamento da síndrome metabólica, distúrbios intestinais e certos tipos de câncer.<sup>1</sup> O desequilíbrio da microbiota intestinal, conhecido como disbiose, e a redução da diversidade bacteriana podem levar a uma variedade de anormalidades metabólicas, como inflamação e estresse oxidativo, impactando negativamente nas condições fisiopatológicas e fisiológicas do hospedeiro.<sup>6</sup>

Além disso, alguns estudos publicados têm relacionado a composição da microbiota intestinal com maior predisposição a obesidade e outras patologias metabólicas<sup>1</sup>, todavia, nem todas as evidências apoiam um papel benéfico para os SCFAs, MUFAs e PUFAs.<sup>7,8</sup>

Ainda há uma grande lacuna sobre a influência da microbiota nos níveis de ácidos graxos plasmáticos, porém sabe-se que o intestino é a fonte principal de SCFAs, pois as concentrações de acetato, propionato e butirato no sangue portal (375  $\mu\text{mol/l}$ ) são quase 5 vezes maiores do que no sangue venoso periférico (79  $\mu\text{mol/l}$ ).<sup>6</sup>

Portanto, há ainda grande dificuldade de comprovação da influência da microbiota nos níveis de ácidos graxos séricos e todos os seus efeitos positivos no metabolismo devido a ausência de um bom quantitativo de estudos em humanos. Além disso, a construção do conhecimento nesse campo é muito comprometida pela falta de dados sobre fluxos reais dos ácidos graxos, de outros ácidos graxos como os de cadeia média e longa e os processos metabólicos por eles regulados.<sup>1</sup>

## 2 JUSTIFICATIVA

A microbiota tem importante papel metabólico, sendo a responsável pela produção de moléculas de sinalização que interferem em diversas cascatas intracelulares por todo o organismo humano, como: intestino delgado, cólon, fígado, baço, coração, músculo esquelético, neurônios, células imunes e tecidos adiposos, sendo algumas delas os ácidos graxos.<sup>1</sup>

Essa microbiota é composta por uma diversa gama de bactérias, contudo, algumas bactérias específicas se mostraram mais abundantes na saúde em comparação com os estados de doença e essas incluem *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* spp., cujas funções incluem fermentação de carboidratos e síntese de vitaminas.<sup>9,10</sup>

Atualmente, o tema vem ganhando visibilidade, entretanto, ainda há certa lacuna em estudos observacionais que avaliem a correlação, especificamente no que se refere aos ácidos graxos séricos, que diferentemente dos ácidos graxos fecais, sofrem influência dietética direta<sup>6</sup>. Além disso, é grande a quantidade de estudos que relacionam os ácidos graxos de cadeia leve (SCFAs) com a microbiota fecal, todavia, não há publicações com grande relevância científica que relatem sobre a influência da microbiota em outros ácidos graxos como os de cadeia média e longa.

Ademais, ainda há grande conflito científico em relação a influência da microbiota intestinal no perfil saúde e doença<sup>11</sup>. Muitos estudos têm sido publicados, todavia, a



dificuldade de coleta e de acesso estudos *in vivo* em humanos tem sido uma limitação para a solidificação desse conhecimento na literatura científica.<sup>7</sup>

Devido à importância dessas duas variáveis na homeostase corporal, a avaliação de uma possível relação entre o perfil de ácidos graxos séricos e concentração fecal de *Bifidobacterium* spp. Poderá impactar no desenvolvimento de planos terapêuticos e diagnósticos mais efetivos.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo primário**

Avaliar a relação entre concentração fecal de *Bifidobacterium* spp. e perfil de ácidos graxos plasmáticos em crianças do Sertão da Bahia.

#### **3.2 Objetivo secundário**

Descrever a composição sérica de ácidos graxos de cadeia média e longa em indivíduos classificados quanto à composição fecal de *Bifidobacterium* spp.

### **4 REVISÃO DE LITERATURA**

#### **4.1 Microbiota intestinal**

A microbiota intestinal consiste em trilhões de procariotos que residem na mucosa intestinal. Em humanos, o trato gastrointestinal é rapidamente colonizado após o nascimento, assim como outras partes do corpo, essas bactérias vivem conosco em simbiose tolerante e contribuem para uma série de processos fisiológicos do hospedeiro. Os constituintes da microbiota, que vão desde genes bacterianos até proteínas e metabólitos são coletivamente referidos como o microbioma. Simbiose, comensalismo e mutualismo prevalecem nesta relação hospedeiro-microbiano, e a discordância nestas relações é frequentemente prejudicial ao hospedeiro. Alterações na flora intestinal (disbiose) e a resposta do hospedeiro ao microbioma têm sido associadas a doenças como obesidade e inflamação crônica.<sup>11</sup>

A colonização do intestino tem dois grandes benefícios. Primeiro, a microbiota educa o sistema imunológico e aumenta a tolerância a imunodeterminantes microbianos e

em segundo lugar, a microbiota atua como um órgão metabólico que pode quebrar componentes alimentares indigestos, degradar compostos alimentares potencialmente tóxicos, sintetizar certas vitaminas e aminoácidos, além de aumentar a biodisponibilidade de alguns produtos de ingestão dietética.

Cada indivíduo tem um microbioma único, cuja composição é influenciada pelo genótipo e fisiologia do hospedeiro, histórico de colonização, fatores ambientais, alimentos e drogas (como é o exemplo dos antibióticos)<sup>1</sup>, sendo assim um regulador central do metabolismo, sofrendo influências do hospedeiro como: genética, dieta, quantidade e a composição dos lipídios e níveis de estresse, sendo os fatores dietéticos os mais influentes, e desempenhando um papel importante nas doenças cardiometabólicas.<sup>6</sup>

A microbiota está intimamente envolvida em vários aspectos da fisiologia normal do hospedeiro, desde o estado nutricional até o comportamento e a resposta ao estresse, colonizando praticamente todas as superfícies do corpo humano que estão expostas ao ambiente externo, como a pele, trato geniturinário, gastrointestinal e respiratório.<sup>12</sup> O microbioma intestinal, tem também a capacidade de executar muitos processos que não podem ser realizados pelo hospedeiro. Esses processos podem dar origem a metabólitos microbianos produzidos ou modulados que funcionam como substratos metabólicos e moléculas de sinalização no hospedeiro, com grandes implicações para o metabolismo e a saúde.<sup>13</sup>

A preservação da homeostase na mucosa intestinal é um dos principais papéis da microbiota intestinal, pois fornece um habitat conveniente a longo prazo. Isso permite com que os processos metabólicos exercidos pela mesma se mantenham e que a homeostase corporal seja eficiente, propiciando assim, melhor controle metabólico, imunológico e inflamatório.<sup>14</sup>

Entretanto, atualmente, ainda não temos elucidada a interferência da microbiota na regulação da adiposidade e surgimento de doenças cardiovasculares (DCV), haja vista que, alguns estudos relacionam o aumento de SCFAs, MUFAs e PUFAs com aumento da adiposidade e padrões lipidogênicos, por conta de maior oferta

energética, e outros os relacionam com diminuição, afinal tais ácidos são importantes ativadores do metabolismo energético.<sup>11,15,16</sup>

Os *Bacteroides* spp. parecem ser o gênero mais abundantes na microbiota, compreendendo aproximadamente 30% das bactérias do intestino, seguidos de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp., o que sugere que esses gêneros sejam particularmente significativos no funcionamento do organismo hospedeiro.<sup>17</sup> *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* spp, estão muito associadas ao processo de saúde e doença, inclusive sendo a sua reposição por meio de probióticos marcada como método de tratamento para diversas patologias.<sup>9,10</sup>

#### **4.2 *Bifidobacterium* spp.**

As bifidobactérias estão entre os colonizadores microbianos pioneiros do trato gastrointestinal e dominam a microbiota intestinal de recém-nascidos amamentados saudáveis e, durante a vida de um adulto, os níveis permanecem relativamente estáveis, tendendo a diminuir na senescência.<sup>18,19</sup>

Embora os papéis de promoção da saúde das bifidobactérias sejam amplamente aceitos, a diversidade delas entre a microbiota intestinal humana ainda é pouco compreendida. As análises mostraram que a população cultivável de amostras intestinais e fecais inclui seis táxons filogenéticos principais, ou seja, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Bifidobacterium breve* e *Bifidobacterium bifidum* possuem uma modesta diversificação das populações, além de ampla capacidade de colonização.<sup>20</sup>

Em geral, acredita-se que as bifidobactérias contribuam para o bem-estar do hospedeiro e estão sendo cada vez mais usadas como probióticos - microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício para a saúde do hospedeiro.<sup>21</sup> Essa possível atividade probiótica inclui papéis diretos e indiretos tais como: redução de doenças infecciosas por meio de produção *in situ* de vitaminas e de acetato gerando efeito protetor e anti-inflamatório<sup>22,23</sup>, alívio de doenças inflamatórias crônicas como por exemplo a colite ulcerativa, melhora de várias condições fisiológicas como a redução da taxa de colesterol ou intolerância à

lactose e redução de riscos que afetam a saúde como doenças atópicas, pela arquitetura semelhante a um biofilme formado pela microbiota na mucosa, estando em contato próximo com o epitélio subjacente, promovendo funções benéficas, incluindo troca de nutrientes e indução da imunidade inata do hospedeiro.<sup>24-26</sup>

As bifidobactérias também influenciam na síntese de ácidos graxos como por exemplo o acetato, butirato e lactato, por meio de metabolização de uma série de carboidratos complexos, sendo o conhecimento atual do metabolismo de carboidratos bifidobacterianos com foco na degradação de poli/oligossacarídeos de plantas.<sup>27-29</sup> Além disso, as bifidobactérias também são associadas à alteração nos níveis séricos de alguns PUFAs ômega- 3 como o ácido docosahexanóico (DHA) e ômega- 6 como o ácido linoleico, por meio no aumento de sua disponibilidade intestinal, mas sem mecanismo subjacente bem elucidado.<sup>5,30,31</sup>

Associado a alterações na microbiota bifidobacteriana específica, como diminuição do número ou composição atípica de espécies, foi identificado um aumento da incidência de algumas doenças como: doenças atópicas<sup>32</sup>, síndrome do intestino irritável, câncer colorretal<sup>33</sup> e doença celíaca<sup>34</sup>, além disso, foi relatado que a disbiose das bifidobactérias precede a obesidade por meio da sua influência nas bactérias intestinais produtoras de butirato<sup>29</sup>.

É importante enfatizar que nenhuma prova definitiva está disponível sobre a relação entre níveis reduzidos de bifidobactérias ou composição alterada das espécies e doenças. No entanto, grandes variações no número ou composição na população bifidobacteriana presente no trato gastrointestinal são talvez as alterações da microbiota intestinal mais frequentemente observadas, estando presente em muitas diferentes patologias. Esse fato sugere um papel importante da população de bifidobactérias na homeostase intestinal.<sup>9</sup>

Apesar do supracitado, o quadro geral de diversos estudos indica que o grau de evidência científica da eficácia dos probióticos em várias patologias, principalmente doenças associadas ao intestino, é inexistente, ou os dados não foram suficientes para chegar a uma conclusão. Na maioria das revisões, a seleção de ensaios de

intervenção humana com probióticos foi uma variedade de estudos sem critérios definidos, o que dificulta que se chegue a um resultado com forte evidência.<sup>35</sup>

Ainda existem muitas barreiras de quantificação da microbiota pois ficou claro que a comunidade microbiana do intestino humano inclui uma fração luminal, bem como uma comunidade de mucosa aderente, que é muito diferente da identificada em amostras de fezes. Assim, a microbiota fecal humana não pode simplesmente ser considerada um reflexo direto da microbiota intestinal. Isso também é corroborado pelo fato de que uma grande parte das bactérias presentes em amostras fecais é derivado da dieta ou de contaminações ambientais e apenas uma parcela é de componentes bacterianos aderentes à mucosa do trato gastrointestinal humano.<sup>36</sup>

### 4.3 Ácidos Graxos

Ácidos graxos são ácidos carboxílicos com uma cadeia alifática, contendo um grupo metílico em uma extremidade e um grupo carboxílico na outra, dependendo do comprimento de suas caudas alifáticas, os ácidos graxos podem ser classificados como ácidos graxos de cadeia curta ou SCFAs (<6 C), média ou MCFAs (6–12 C) ou longa ou LCFAs (>12 C), sendo ainda classificados em ácidos graxos saturados (SFAs) sem ligações duplas (tabela 1), ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) com apenas uma ligação dupla (tabela2) e ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) com pelo menos duas ligações duplas (tabela 3).

**Tabela 1-** Ácidos graxos saturados fisiologicamente mais importantes.

Número de átomos de carbono: número de ligações duplas	Nome	Nomenclatura sistemática (IUPAC)	Fórmula Química
10:0	Cáprico	Decanoico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_8-\text{COOH}$
12:0	Láurico	Dodecanoico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{COOH}$
14:0	Mirístico	Tetradecanoico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{12}-\text{COOH}$
16:0	Palmitico	Hexadecanoico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{COOH}$

Número de átomos de carbono: número de ligações duplas	Nome	Nomenclatura sistemática (IUPAC)	Fórmula Química
18:0	Esteárico	Octadecanoico	CH <sub>3</sub> –(CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> –COOH
20:0	Araquídico	Eicosanoico	CH <sub>3</sub> –(CH <sub>2</sub> ) <sub>18</sub> –COOH

**Tabela 2-** Ácidos graxos monoinsaturados mais comuns.

Número de átomos de carbono: número de ligações duplas	Nome	Nomenclatura sistemática (IUPAC)	Fórmula Química
16:1	Palmitoleico	CIS-9-hexadecenoico	CH <sub>3</sub> –(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> –CH=CH–(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> –COOH
18:1	Oleico	CIS-9-octadecenoico	CH <sub>3</sub> –(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> –CH=CH–(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> –COOH

**Tabela 3-** Ácidos graxos poliinsaturados fisiologicamente mais importantes.

Número de átomos de carbono: número de ligações duplas	Nome	Nomenclatura sistemática (IUPAC)	Fórmula Química
18:2 (ω-6)	Linoleico	9,12-Octadecadienoico	CH <sub>3</sub> –(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> –CH=CH–CH <sub>2</sub> –CH=CH–(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> –COOH
20:4 (ω-6)	Araquidônico	5,8,11,14-Eicosatetraenoico	CH <sub>3</sub> –(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> –CH=CH–CH <sub>2</sub> –CH=CH–CH <sub>2</sub> –CH=CH–(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> –COOH
18:3 (ω-3)	α-linolênico	9,12,15-Octadecatrienoico	CH <sub>3</sub> –CH <sub>2</sub> –CH=CH–CH <sub>2</sub> –CH=CH–CH <sub>2</sub> –CH=CH–(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> –COOH

Os SFAs são derivados principalmente de produtos de origem animal e lácteos, óleos de coco e de palma, enquanto os MUFAs e PUFAs, são encontrados em azeite, nozes e em alguns peixes gordurosos. Essas variações estruturais levam a diferenças na absorção, transporte e até mesmo destino desses ácidos graxos. <sup>2,37</sup>

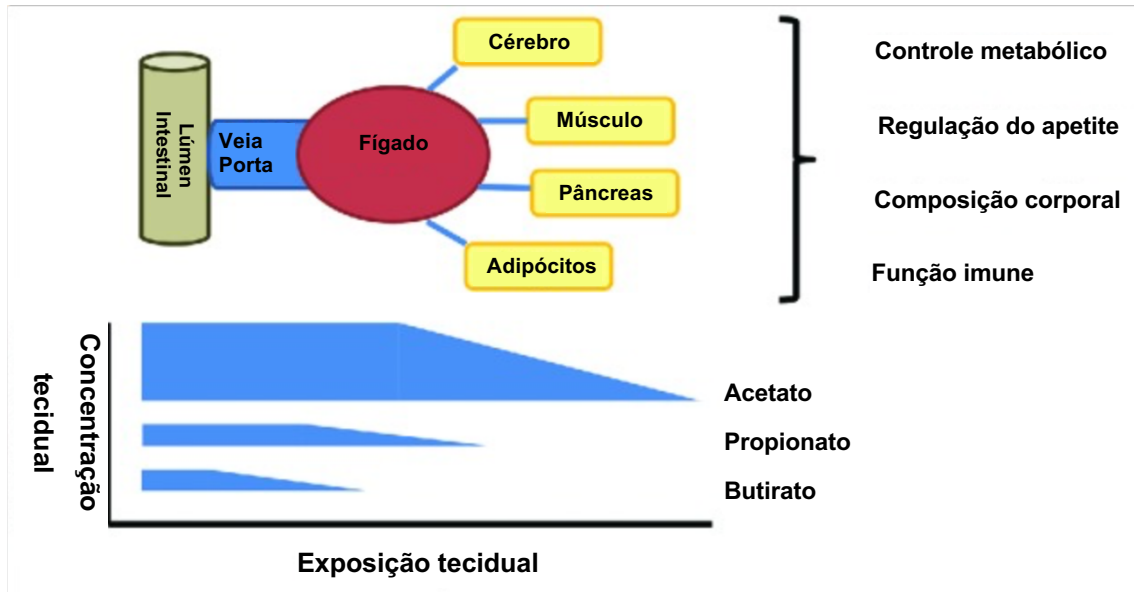
Os SCFAs mais importantes incluem: acetato (C2:0), propionato (C3:0), butirato (C4:0) e valerato (C5:0), e suas propriedades químicas dependem do número de carbonos<sup>6</sup>, sendo eles os que possuem maior evidência de influência no metabolismo humano e na microbiota intestinal.

Os SCFAs atuam como moléculas de sinalização tanto nas células intestinais quanto em outras células teciduais. Graças a esses mecanismos diretos, os SCFAs podem desempenhar papéis benéficos na saúde humana, como melhoria da integridade da barreira intestinal, regulação da pressão arterial, ingestão de energia e seu uso, modulação de hormônios intestinais, modulação do metabolismo da glicose e lipídios, mediação do sistema imunológico e da resposta anti-inflamatória.<sup>1,6</sup>

Os SCFAs são produzidos no intestino, absorvidos pela circulação entérica e seguem para circulação porta, chegam ao fígado e a partir daí são distribuídos para a circulação sistêmica atingindo os órgãos alvo como: músculo, pâncreas e cérebro<sup>6</sup> (imagem 1); enquanto os MCFAs são absorvidos do trato gastrointestinal e transportados através da veia porta diretamente para o fígado para oxidação rápida, já os LCFA são embalados em quilomícrons e viajam pelo sistema linfático, permitindo maior absorção pelo tecido adiposo.<sup>38</sup>

É relatado que a maioria dos ácidos graxos de origem alimentar, como os MUFAs e PUFAs, são muito bem absorvidos pelo trato gastrointestinal, por conta de eficientes processos de digestão, tendendo a ter níveis séricos relevantes e refletindo a relação entre ingesta e disponibilidade sistêmica.<sup>39,40</sup>

**Imagem 1** – local de ação dos ácidos graxos de cadeia curta



Fonte: Nogal A, Valdes AM, Menni C. The role of short-chain fatty acids in the interplay between gut microbiota and diet in cardio-metabolic health. Vol. 13, Gut Microbes. Bellwether Publishing, Ltd.; 2021. p. 1–24- adaptado.<sup>6</sup>

Os SCFAs produzidos pela microbiota intestinal são associados a diversas funções metabólicas como: o propionato (C3:0) que atua na regulação da integridade da barreira epitelial, gerando redução de cascata de inflamação que é ativada via translocação bacteriana intestinal, a qual tem sido associada à obesidade, resistência à insulina e inflamação crônica, além da melhora na homeostase hepática e da glicose.<sup>41</sup>

O acetato (C2:0) plasmático está associado a melhoria da resposta à insulina em células  $\beta$  pancreáticas, mediada pelo FFAR2, o que induz um melhor controle da glicose, além de ter sido associado à supressão da lipólise de adipócitos.<sup>42</sup>

Já o butirato (C4:0) é usado como combustível para colonócitos. Experimentos *in vitro* demonstraram que o mesmo desempenha um papel fundamental na manutenção da função de barreira intestinal, preservando a anaerobiose luminal. Em particular, o butirato parece exercer amplas atividades anti-inflamatórias, afetando a migração de células imunes, a adesão, a expressão de citocinas, bem como afetando processos celulares, como proliferação, ativação e apoptose, apresentando-se nos estudos mais recentes como um potencial fator protetor contra o câncer de cólon.<sup>43</sup>



Também há relevância científica em relação aos ácidos graxos de cadeia média (MCFA), representados principalmente pelo: cáprico e láurico; e de longa (LCFA), representados principalmente pelo: mirístico, palmítico, esteárico, palmitoleico, linoleico, oleico, elaídico, esteárico, araquidônico e araquídico, cada um desempenhando sua função específica no metabolismo humano.<sup>44</sup>

Os MUFAs e PUFAs tem origem dietética e não são produzidos pela microbiota intestinal, mas sofrem ação da mesma e atuam sobre a concentração e biodisponibilidade bacteriana, principalmente de bifidobactérias, além de serem associados a diversas funções metabólicas e efeitos cardiovasculares.<sup>8</sup>

O ácido cáprico (C10:0) está presente em óleos vegetais, como óleo de palma e óleo de coco, leite de mamíferos e algumas sementes. Vários estudos mostraram que ele tem ação variada em alvos que incluem receptores de vias de estresse inflamatório/oxidativo. Com base nessas linhas de evidência, esse ácido provou ser eficaz na melhoria de doenças neurológicas, como epilepsia, distúrbios afetivos e doença de Alzheimer, além de ser efetivo na resistência à insulina e ter importantes efeitos anti-inflamatórios e antimetastáticos.<sup>45-48</sup>

O ácido palmítico (C16:0) é um dos importantes ácidos constituintes dos triglicérides (TG) no tecido adiposo. Considera-se que o ácido palmítico está ligado a eventos cardiovasculares adversos e que seu consumo em grande quantidade aumenta o risco de DCV, elevando níveis de LDL e HDL plasmáticos, assim como a resposta inflamatória endógena, além disso, níveis elevados de ácido palmítico e provavelmente outros SFAs foram associados à contribuição significativa para danos cardíacos.<sup>49</sup>

O ácido mirístico (C14:0) está presente em concentrações relativamente baixas em tecidos humanos. Apesar de estar em menor concentração sérica em relação aos outros SFAs, ele tem atraído atenção crescente por causa de evidências clínicas que sugerem sua potente ação lipidogênica, aumentando todas as frações do colesterol.<sup>50</sup>

Em contraste com o ácido palmítico, que se correlaciona com a hipercolesterolemia, tem relação contraditória na DCV, alguns estudos consideram que dietas enriquecidas

em ácido esteárico (C18:0) resultaram em menores concentrações plasmáticas de LDL e HDL em jejum, não sabendo se sua ação se deve a influência direta nos mecanismos de produção ou se por influência na microbiota intestinal, já outros estudos alegam que não há influência direta desse ácido no perfil lipídico.<sup>51</sup>

O ácido linoleico (C18:2) é o PUFA mais abundante na dieta humana, embora possa ser metabolizado em Ácido Araquidônico (AA), um precursor dos eicosanóides, incluindo alguns com ação pró-inflamatória ou protrombótica-vasoconstritora, a grande maioria dos estudos experimentais e clínicos avaliou o benefício potencial desse ácido. No geral, dados de estudos clínicos e metanálises sugerem uma associação entre altas ingestão dietética ou níveis teciduais de ômega 6 PUFA, e especificamente ácido linoleico, e a melhoria do risco cardiovascular, principalmente do perfil lipídico plasmático, bem como controle glicêmico e melhora da resistência à insulina, o que faz com que o mesmo tenha papel importante na incidência reduzida de doenças cardiovasculares, principalmente doenças arteriais coronarianas, síndrome metabólica e diabetes tipo 2.<sup>52,53</sup>

O ácido palmitoleico (C16:1) é um dos principais MUFAs, com evidências de que é um dos principais produtos da lipogênese endógena. No corpo humano, a biossíntese do ácido *cis*-palmitoleico prossegue principalmente no fígado e, em menor grau, no tecido adiposo, onde é posteriormente incorporado em fosfolípidios, TG e ésteres de colesterol, mas sua influência no sistema cardiovascular é inconsistente.<sup>54</sup>

Em alguns ensaios clínicos randomizados, o consumo de cápsulas ou dietas ricas em ácido palmitoleico tem sido associado a concentrações mais baixas de colesterol LDL e TG no sangue e a uma regulação substancial do colesterol HDL, já outros estudos descobriram correlações entre ele e aumento de fatores de risco cardiovascular como hipertensão; altos níveis sanguíneos de colesterol total, LDL e TG. No entanto, a maioria dos investigadores tende a acreditar que, para indivíduos com dislipoproteinemias definitivas, o ácido palmitoleico como suplemento nutricional pode ser a principal intervenção para melhorar o perfil lipídico no sangue.<sup>8,55</sup>

O ácido oleico (C18:1) é o MUFA mais prevalente nos alimentos humanos. Constitui aproximadamente metade do conteúdo de ácidos graxos e TG no tecido adiposo.

Pesquisas sobre ácido oleico revelaram sua influência no sistema cardiovascular, melhorando o perfil lipídico, resistência à insulina e sinalização relacionada à inflamação em células neuronais e musculoesqueléticas, além de diminuir o risco de aterosclerose. No entanto, os mecanismos moleculares responsáveis pelos efeitos protetores do ácido oleico contra a DCV são pouco estudados.<sup>8,56</sup>

O ácido  $\alpha$ -linolênico (C18:3) tem provável potencial, se elevado, de reduzir ligeiramente o risco de mortalidade por doenças isquêmicas e arritmia, e pode reduzir ligeiramente o risco de DCV, diminuindo níveis de LDL, colesterol total e TG.<sup>57</sup> Há necessidade de mais estudos prospectivos para esclarecer a ligação entre ele e DCV, mas alguns autores acreditam nos seus efeitos protetores moderados no sistema cardiovascular.<sup>58</sup>

Pesquisas epidemiológicas indicam que os SFA, especialmente aqueles que contêm 12-16 átomos de carbono, têm o maior efeito na concentração sanguínea de colesterol LDL e, portanto, são frequentemente associados, tanto a um maior risco de DCV, quanto à gravidade das lesões ateroscleróticas nas artérias.

Todavia, estudos afirmam que o aumento do consumo de PUFA é o método mais eficiente para a normalização do valor lipídico no sangue, sendo ainda controverso, haja vista que meta-análises da Cochrane trazem, por meio de evidências de qualidade moderada, que os PUFAs reduzem o risco de eventos cardiovasculares, já outras meta-análises afirmam que há pouco ou nenhum efeito do seu uso na saúde cardiovascular em prevenção primária ou secundária.<sup>57,59,60</sup>

#### **4.4 Impacto da microbiota sobre a concentração de ácidos graxos**

Para a produção de SCFAs, é importante que a microbiota intestinal funcione como uma comunidade, mas também que a microbiota intestinal tenha associações simbióticas com o hospedeiro.<sup>1</sup>

Embora, muito se saiba sobre a bioquímica da conversão de carboidratos em SCFAs pelas bactérias que compõem a comunidade microbiana, há uma escassez de dados sobre as taxas de produção de SCFAs e outros tipos de ácidos graxos pela

comunidade microbiana intestinal como um todo. Isso se deve em grande parte à incapacidade de estudar o intestino grosso dos humanos.<sup>1</sup>

A microbiota intestinal é afetada pela dieta, como em um estudo com camundongos em que uma dieta rica em gorduras gerou alterações no padrão da microbiota levando a uma redução dramática na diversidade microbiana, conseqüentemente afetando a produção de ácidos graxos e o peso dos animais.<sup>61</sup>

Em estudos em humanos, foi comprovado que uma dieta rica em fibras gera alterações na composição e diversidade da microbiota intestinal, além de acarretar a mudança quantitativa e de composição dos ácidos graxos fecais, levando a alterações como aumento de adiposidade, aumento da fome, desaceleração do metabolismo energético e até mesmo alterações imunológicas.<sup>62,63</sup>

A origem dos SFAs é intestinal, sendo produzidos pela microbiota colônica e absorvidos pela circulação entérica, já os PUFAs e MUFAs são de origem alimentar, mas alguns microrganismos intestinais, como bifidobactérias, afetam diretamente na sua disponibilidade modulando seu metabolismo e absorção a nível entérico.<sup>5,64,65</sup>

Há estudos sobre as bactérias intestinais dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* reagirem com ligações duplas de ácidos graxos para produzirem metabólitos que não podem ser sintetizados por hospedeiros, como por exemplo, o processamento bacteriano do ácido linoleico conjugado.<sup>65</sup>

Contudo, atualmente não existem muitos estudos que correlacionam a concentração de ácidos graxos séricos com a composição da microbiota pois as associações com a via funcional da microbiota intestinal, a ingestão dietética, os SCFAs séricos e fecais, disponibilidade MUFA e PUFA permanecem incertas.<sup>4,66</sup>

## **5 MÉTODOS**

### **5.1 Desenho do estudo**

Estudo transversal, analítico observacional.

### **5.2 População acessível**

Crianças e adolescentes matriculados nos diversos níveis educacionais em escolas municipais em zona rural e urbana de quatro municípios do Sertão da Bahia: Serrinha, Biritinga, Barrocas e Teofilândia que integram projeto maior intitulado “AVALIAÇÃO DE UM PROJETO DE INTERVENÇÃO NA MERENDA ESCOLAR SOBRE A SAÚDE DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES NO SERTÃO DA BAHIA”, com dados coletados em 2018-2019.

### **5.3 Critérios de inclusão**

Escolares com diferentes classificações antropométricas, regularmente matriculados em diversos níveis educacionais em escolas municipais de ensino dos quatro municípios do Sertão da Bahia: Serrinha, Biritinga, Barrocas e Teofilândia, com idade entre 5 e 19 anos, sem diagnóstico prévio de doenças que possam interferir em seu estado nutricional (diabetes, doença celíaca, entre outros).

### **5.4 Critérios de exclusão**

Participantes que recusaram participar da pesquisa (não assinatura do TCLE e/ou assentimento) e escolares que tenham utilizado antibióticos nos 30 dias que antecederem a coleta do material fecal, foram excluídos do estudo.

### **5.5 Variáveis**

As variáveis do estudo que foram analisadas são: demográficas- idade (5-19 anos), sexo (feminino e masculino) e procedência (rural, urbana e município), clínicas- IMC e estado nutricional e laboratoriais- ácidos graxos séricos e concentração fecal de *Bifidobacterium* spp..

### **5.6 Coleta de dados**

A coleta de dados dos participantes foi realizada por meio de entrevista, exame clínico e exames laboratoriais. Para realização desta etapa, cada escola envolvida no estudo fez a reserva de pelo menos duas salas, no intuito de garantir a privacidade dos integrantes durante a coleta, sendo uma sala reservada para a entrevista e para exame clínico, sendo respondidos os tópicos do Anexo A, e, outra para os exames laboratoriais.

### **Medida do peso**

A aferição do peso dos participantes foi feita em quilogramas por meio de uma balança portátil, microeletrônica, marca Welmy, modelo W 200 M, com capacidade para 136 kg e variação de peso de 100g. Este instrumento é credenciado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) e foi regularmente calibrado pela assistência técnica. Para essa aferição, as crianças e adolescentes foram posicionadas de modo ereto, no centro da balança, com o peso distribuído igualmente em ambos os pés, descalços e com os uniformes escolares.

### **Medida da estatura**

A estatura dessas crianças e adolescentes foi aferida por meio de um estadiômetro da marca Altura Exata, com graduação de 10 em 10 centímetros, com limite de 2,13 m. Para isso, os estudantes foram posicionados de forma ereta, com pés unidos e descalços.

### **Classificação do estado nutricional**

Para classificar o estado nutricional das crianças e adolescentes foi utilizado o IMC (índice de massa corporal), calculado a partir da fórmula de Quetelet (peso em kg/altura<sup>2</sup> em metros), de forma que foi necessário aferir inicialmente o peso e estatura dos participantes.

Após o cálculo do IMC, os indivíduos foram divididos em cinco grupos, sendo que essa divisão foi baseada na análise de escore Z (IMC – Idade) das curvas de crescimento infantil da OMS. As cinco categorias utilizadas serão: magreza extrema (escore Z < -3), magreza (-3 < escore Z < -2), eutrofia (-2 < escore Z < +1), sobrepeso (+1 < escore Z < +2), obesidade (+2 < escore Z < +3) e obesidade grave (+3 < < escore Z). Os dados foram analisados por meio de software WHO Anthro plus (versão 3.2.2).

### **Concentração fecal de *Bifidobacterium* spp.**

Para classificar a concentração fecal de bifidobactérias, os indivíduos foram separados em 2 grupos, alta/moderada concentração, que são os grupos com maiores concentrações de BIF e baixa concentração, por meio do cálculo de percentis, no qual foram consideradas altas/moderadas concentrações de bifidobactérias valores de

concentração > ao percentil 25 (123,44 - 2812,64) e baixa concentração de bifidobactérias valores  $\leq$  ao percentil 25 (114,38).

### 5.7 Determinação dos ácidos graxos

A extração de lipídios do plasma e consequente produção de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) foram realizados de acordo com o método descrito por Ostermann *et al.* e Santos *et al.* com modificações.<sup>67,68</sup>

Uma amostra de 200 $\mu$ L de plasma humano foi colocada em um tubo de eppendorf (1,5mL), foi adicionado 7 $\mu$ L de solução de controle interno a 1mM (ácido azelaico), acrescentado 300 $\mu$ L de metanol (MEOH), seguido de homogeneização por vortex por 30 segundos. Após isto, adicionou-se 600 $\mu$ L de éter metil-terc-butílico (MTBE), sendo homogeneizado por vortex por 30 segundos para, finalmente, acrescentar uma solução única contendo 300 $\mu$ L de acetato de amônio a 0,15mM e 36  $\mu$ L de Ácido Acético a 250mM com homogeneização por vortex por 30 segundos.

A amostra foi centrifugada a 3500g por 5 minutos, sendo coletada a fase orgânica e colocada em um novo tubo de eppendorf, previamente pesado. Foi adicionado mais 300 $\mu$ L de MTBE no volume restante (fase aquosa), com intuito de realizar uma segunda extração e coletar a maior quantidade possível de lipídios, seguido de homogeneização por vortex por 05 segundos e centrifugada a 3500g por 5 minutos.

A fase orgânica foi novamente coletada, combinando- a com a primeira coleta. Após secagem do solvente orgânico em capela de exaustão, os tubos foram novamente pesados para aferir a massa de lipídeos extraídos.

As amostras de lipídios extraídas do plasma humano foram derivatizadas, baseando – se no método descrito por Santos *et al.*<sup>68</sup>, visando a formação de FAMEs. Uma solução de 240 $\mu$ L de reagente de saponificação (0,5M de NaOH em metanol) foi adicionada para ressuspensão do extrato lipídico, por meio da homogeneização por vortex durante 30 segundos. As amostras foram colocadas em uma cuba ultrassônica por 5 minutos a 42Khz e 160W para garantir total homogeneização do extrato lipídico.

Ao retirar as amostras da cuba ultrassônica foi adicionado, 300uL por amostra, uma solução de derivatização (9,52mg de Cloreto de Amônio, 14,1uL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e de 285,72uL de metanol). Os tubos Eppendorf foram retornados à cuba ultrassônica por 10 minutos, e, posteriormente, foi adicionado a cada tubo 240uL de uma solução saturada de NaCl (86,4mg de NaCl, 240uL de H<sub>2</sub>O), seguida por homogeneização por vortex por 30 segundos. Para a extração dos FAMES foi adicionado 250ul de Hexano em cada tubo e homogeneizado por vortex por 30 segundos. Os tubos foram levados ao freezer por 24 horas a -20°C. As amostras foram preparadas para a corrida no cromatógrafo: tais amostras foram descongeladas e centrifugadas por 30seg a 3500g e então, foi coletado o extrato orgânico superior e colocado em um insert de vidro.

A cromatografia gasosa foi realizada em uma coluna capilar J&W VF-5MS (60m x 0,25mm x 0,25µm) utilizando, um cromatógrafo Focus GC (Thermo Scientific, série número 10902047) equipado com um detector por ionização de chamas (Flame Ionizing Detector - FID). A separação cromatográfica utilizou o seguinte gradiente de temperatura: 170°C-210°C utilizando rampa de 10°C por minuto; 210-260°C utilizando rampa de 3°C por minuto (o método tem duração total de ~36 min). O gás hélio foi utilizado como carreador em fluxo constante de 1,5ml/minuto. O "Inlet" (câmara de injeção) foi mantido a 300°C e 2µL das amostras foram injetados manualmente, em modo "split" com razão de 1:10. O detector por ionização de chamas foi mantido a 300°C com fluxo de gases (hidrogênio, ar sintético, nitrogênio) padrão do aparelho.

Os cromatogramas foram obtidos pelo software ChromaQuest 5. Os picos dos ácidos graxos foram identificados através da comparação com os tempos de retenção de padrões previamente reconhecidos [F.A.M.E. Mix C8-c24 (SIGMA-ALDRICH); Fatty Acids Unsaturated Kit (SIGMA-ALDRICH)]. As áreas correspondentes dos picos identificados individualmente foram normalizadas em relação à área do controle interno, ácido azelaico C7:0.

### **5.8 Análise da microbiota**

As amostras de fezes foram coletadas em duplicata pelos participantes e ou responsáveis legais, sendo acondicionadas em recipientes estéreis fornecidos pela equipe de pesquisa, para análise da microbiota fecal. O material foi entregue para a equipe de pesquisa e transportado a 4° C até laboratórios privados de apoio local,



onde foi feita a extração de uma alíquota que, posteriormente, foi transportada em gelo seco até o Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX), no Instituto Gonçalo Moniz (IGM) - Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), na cidade de Salvador, para ser armazenado a -20° C até o momento da análise. O restante do material fecal foi encaminhado para análise parasitológica em um laboratório privado em Salvador.

A extração do DNA bacteriano das fezes foi feita com o kit QIAamp PowerFecal DNA Kit® (QIAGEN, Canadá), de acordo com as especificações do fabricante. Foi feita quantificação e análise da pureza do DNA extraído, utilizando o equipamento de espectrofotometria NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

A quantificação da microbiota de interesse foi feita pelo método Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR), usando o equipamento Real-time PCR 7500® (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). Para quantificação das bactérias totais - Total Bacteria (TB) foram usados os iniciadores Primer Forward ACTCCTACGGGAGGCAGCAG e Primer Reverse ATTACCGCGGCTGCTGG, e para análise de *Bifidobacterium* spp. (BIF) foram usados os iniciadores Primer Forward GCGTGCTTAACACATGCAAGTC e Primer Reverse CACCCTTTCCAGGAGCTATT (Ludwig Biotecnologia®).

As análises foram feitas usando 1 µL da amostra de DNA extraído, 5 µL de Sybr Green Master Mix® (Applied Biosystems, Estados Unidos), 0,1 µL de Primer Forward, 0,1 µL de Primer Reverse e 3,8 µL de água ultrapura, somando na reação final 10 µL em cada poço da placa. O processo foi feito tanto para quantificação do gene de referência (TB) quanto para quantificação de Bifidobactérias (BIF). A programação de amplificação executada no equipamento foi: 50° C por 2 minutos, 95° C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos a 95° C por 1 segundo e a 60° C por 1 minuto, adicionando a Melt Curve Stage (95° C por 15 segundos, 60° C por 1 minuto, 95° C por 30 segundos, 60° C por 15 segundos).

O software acoplado ao equipamento fornece o resultado da amplificação do DNA alvo na forma de um valor de ciclo de limiar - Threshold Cycle (Ct). Dele foi extraído um valor de delta Ct ( $\Delta Ct$ ), resultado da subtração do Ct do gene alvo (BIF) do Ct do gene de referência (TB), conforme demonstrado na equação 1. Os resultados da

quantificação foram apresentados em Unidades de Expressão Relativa - Relative Expression Units (REU), dividindo 10.000 por 2 elevado a delta Ct, de acordo com o modelo de Albesiano e colaboradores<sup>69</sup>, conforme demonstrado na equação 2. Esses resultados expressam uma estimativa da abundância do gênero bacteriano de interesse em relação ao total de bactérias da amostra.

Equação 1:

$$\Delta Ct = Ct \text{ do gene alvo (BIF)} - Ct \text{ do gene de referência (TB)}$$

Equação 2:

$$REU = 10.000 \cdot 2^{-\Delta Ct}$$

### **5.9 Aspectos éticos**

Este estudo é um subprojeto do projeto guarda-chuva intitulado “AVALIAÇÃO DE UM PROJETO DE INTERVENÇÃO NA MERENDA ESCOLAR SOBRE A SAÚDE DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES NO SERTÃO DA BAHIA” já tendo sido submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências (CAAE: 35038914.3.0000.5544), Anexo B, e, os pesquisadores envolvidos se comprometeram a seguir as recomendações todas as determinações das Resoluções 466/12 e 510/16 do Ministério da Saúde.

Por se tratar de uma pesquisa envolvendo crianças e adolescentes, todos participantes assinaram o Termo de assentimento livre e esclarecido (TALE) e os responsáveis o Termo de consentimento livre esclarecido (TCLE).

Os riscos envolvendo este estudo são mínimos, mas cabe pontuar que podem ter sido gerados incômodos nas crianças e adolescentes durante a fase de entrevista, exame clínico e coleta de amostra biológica. Além disso, há também um pequeno risco de vazamento de dados pessoais dos participantes.

Para garantir o máximo de proteção dos integrantes do estudo, durante a fase da coleta de dados os pesquisadores se comprometeram a prestar e/ou disponibilizar assistência aos participantes em casos de diagnóstico de patologias ou desconfortos relacionados à contribuição para o estudo.

## **6 AMOSTRA**

## **6.1 Tipo**

Amostra de conveniência

## **6.2 Fonte dos dados**

A análise da microbiota foi feita a partir de uma base de dados secundária, já coletada previamente por outros pesquisadores para um estudo maior de título “Avaliação de um projeto de intervenção na merenda escolar sobre a saúde de crianças e adolescentes no Sertão da Bahia” e a análise dos ácidos graxos foi oriunda de coleta primária desta pesquisa vigente.

## **6.3 Cálculo amostral**

O estudo guarda-chuva “Avaliação de um projeto de intervenção na merenda escolar sobre a saúde de crianças e adolescentes no Sertão da Bahia”, do qual este projeto deriva, considerou um o número de 35.000 alunos nos quatro municípios estudados e uma frequência de obesidade/sobrepeso de aproximadamente 20% em escolares. Foi realizado um cálculo amostral, através da estatística Z com auxílio da calculadora eletrônica “Win Pepi”. Para um intervalo de confiança de 95%, estabeleceu-se um n de 1500 participantes para avaliação antropométrica.

Dentre o total de participantes, foi randomizada uma sub-amostra de 350 participantes submetidos também a avaliação laboratorial. As escolas estudadas foram randomizadas, respeitando igual proporção entre alunos da zona rural e urbana.

Para realização desta pesquisa, foi trabalhado apenas com a sub-amostra submetida a avaliação laboratorial, que inicialmente era composta por 350 participantes. No entanto, durante o processamento das amostras laboratoriais houve perda de amostras por hemólise e outras dificuldades técnicas para coleta de fezes. De forma que 124 amostras foram recebidas, dessas 124 amostras foram selecionadas 100, todavia, por intercorrências laboratoriais e logísticas esta pesquisa foi realizada com 59 participantes.

## **7 PLANO DE ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Com os dados coletados foi construído um banco de dados no programa REDCap e análise de dados foi feita no programa IBM SPSS Statistics 26.0. Inicialmente foi analisada se a distribuição das variáveis numéricas em simétrica através dos testes Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-wilk e D'Agostino-Pearson. Após esta análise, foram aplicados os testes estatísticos, os quais foram escolhidos de acordo com a variável dependente e o número de grupos analisados.

As variáveis numéricas com distribuição normal foram apresentadas por meio de média e desvio padrão, as variáveis com distribuição anormal foram representadas por meio de mediana e intervalo interquartil, já as variáveis categóricas foram apresentadas por meio de número absoluto e frequência.

A análise das variáveis em dois grupos, não pareadas com distribuição não normal foi feita utilizando o teste de Mann-Whitney, já para as não pareadas com distribuição normal foi feita utilizando o teste T Student não pareado.

## 8 RESULTADOS

A amostra do estudo foi composta por 59 escolares do Sertão baiano, sendo a mediana das idades de 9 (7,00-10,00). Houve discreta predominância do sexo feminino, totalizando 30 meninas (50,8%). Ao todo, 34 crianças e adolescentes viviam na zona urbana e 25 na zona rural, sendo Serrinha o município com maior expressividade na amostra totalizando 32 pacientes (54,2%).

A mediana do IMC dos escolares da amostra foi de 17,0 (IQQ/15,15 - 20,5). O estado nutricional dos participantes da pesquisa foi determinado com base no escore Z (IMC – Idade), sendo que do total das crianças e adolescentes foram classificados: 2 com magreza, 33 com eutrofia, 11 com sobrepeso, 7 com obesidade e 6 com obesidade grave. (Tabela 4).

**Tabela 4** – Características sociodemográficas e antropométricas de 59 escolares do Sertão da Bahia.

Variáveis	n=59
Aspectos sociodemográficas	Médiana (IQQ)

<b>Idade (anos)</b>	9,00 (7,00-10,00)
<b>Sexo</b>	n (%)
Masculino	29 (49,2)
Feminino	30 (50,8)
<b>Zona</b>	
Rural	25 (42,4)
Urbana	34 (57,6)
<b>Município</b>	
Serrinha	32 (54,2)
Teofilândia	7 (11,9)
Barrocas	11 (18,6)
Biritinga	9 (15,4)
<b>Antropometria</b>	Mediana (IIQ)
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	17 (15,15 – 20,5)
<b>Estado nutricional</b>	n (%)
Magreza	2 (3,4)
Eutrofia	33 (55,9)
Sobrepeso	11 (18,6)
Obesidade	7 (11,9)
Obesidade grave	6 (10,2)

**Estado Nutricional:** Magreza extrema: escore Z (IMC – Idade) < -3; Magreza: -3 < escore Z (IMC – Idade) < -2; Eutrofia: -2 < escore Z (IMC – Idade) < +1; Sobrepeso: +1 < escore Z (IMC – Idade) < +2; Obesidade: +2 < escore Z (IMC – Idade) < +3; Obesidade grave: +3 < escore Z (IMC – Idade).

A microbiota foi representada em Unidades de Expressão Relativa (REU). A mediana das concentrações de microbiota foi de 1088,18 (114,38 – 2812,64). Um total de 44 pacientes (74,6%) possui concentração de bifidobactérias alta e moderada e 15 pacientes baixa concentração de bifidobactérias. (tabela 5).

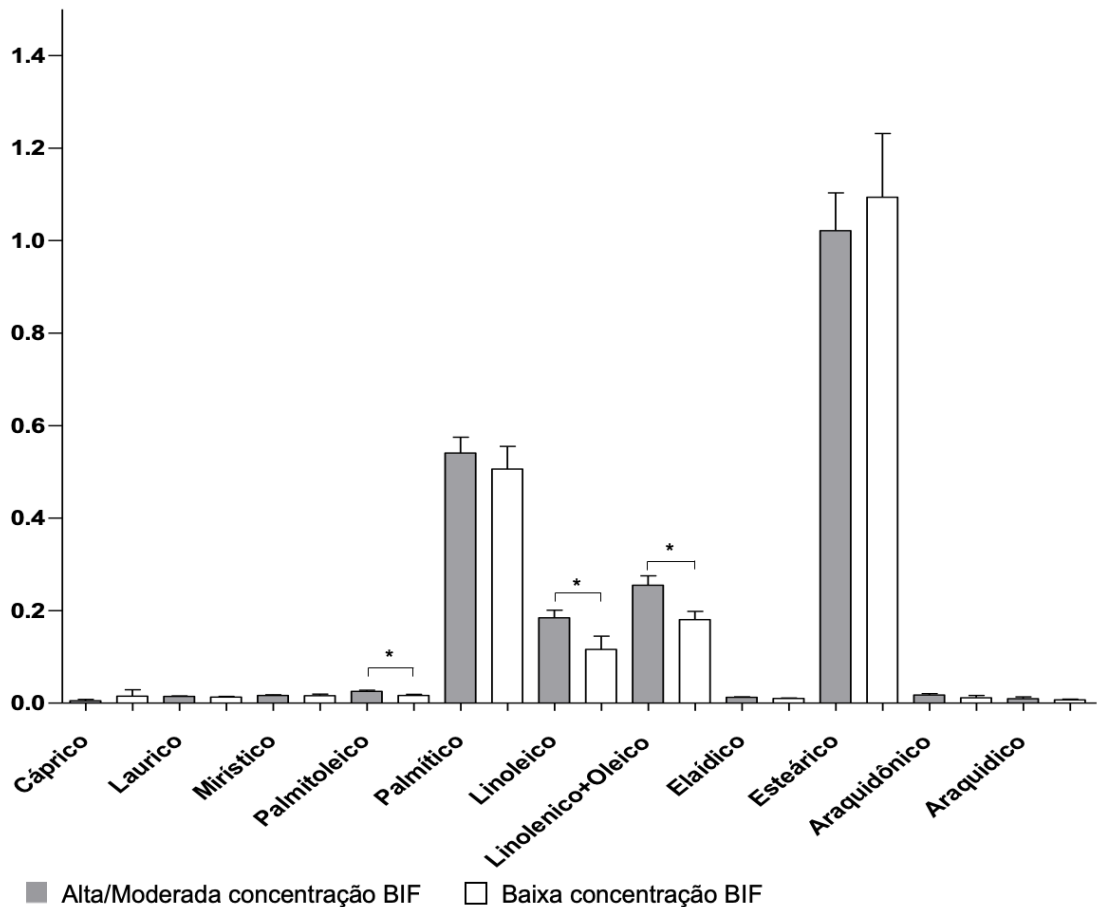
**Tabela 5 – Concentração de microbiota de bifidobactérias.**

Variáveis	n=100
<b>Concentração da microbiota</b>	Mediana (IIQ)
<i>Bifidobacterium</i> spp. (REU)	1088,18 (114,38 – 2812,64)
<b>Classificação da concentração da microbiota</b>	n %
Baixa concentração	15 (25,4)
Alta/moderada concentração de bifidobactérias	44 (74,6,)

**REU:** Unidade relativa de expressão; foram consideradas altas/moderadas concentrações de bifidobactérias valores de concentração > ao percentil 25 (123,44 - 2812,64) e baixa concentração de bifidobactérias valores ≤ ao percentil 25 (114,38).

Os ácidos graxos identificados nas amostras foram: cáprico(C8:0), láurico(C12:0), mirístico (C14:0), palmitoleico (C16:1), palmítico (C16:0), linoleico (C18:2), linolênico+oleico (C18:3 + C18:1), elaídico (C18:1), esteárico (C18:0), araquidônico (C20:4) e araquídico (C20:0), sendo representados em área referentes aos picos do cromatograma. Foram identificados valores de p estatisticamente relevantes ( $P < 0,05$ ), entre os grupos alta/moderada concentração de BIF e baixa concentração de BIF, nos ácidos graxos: palmitoleico (p 0,02), linoleico (p 0,01) e linolênico + oleico (p 0,033);

Apesar de valores de p não significativos em relação aos ácidos cáprico e esteárico, é observada tendência a maiores concentrações destes em pacientes do grupo baixa concentração de microbiota, assim como o contrário ocorre no ácido palmítico, o qual apresenta maiores concentrações de ácidos graxos no grupo alta/moderada concentração de BIF (Gráfico 1).

**Gráfico 1 – Relação ácidos graxos e microbiota de BIF**

**Legenda:** Área dos picos dos ácidos graxos e microbiota de BIF. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão

## 9 DISCUSSÃO

O presente estudo conta com um total de 59 escolares do sertão baiano matriculados nos mais diversos níveis educacionais e sem diagnóstico prévio de doenças que possam interferir no seu estado nutricional ou em suas coletas de material a ser pesquisado. Sendo a mediana das idades de 9 (7,00-10,00), a maioria dos participantes do sexo feminino, totalizando 30, com maior expressividade da zona urbana (34) e Serrinha sendo o município com maior quantidade de pacientes (32).

A microbiota tem sido cada vez mais estudada, principalmente sua relação com a saúde do hospedeiro, sua forte contribuição com os níveis de ácidos graxos plasmáticos já foi relatada, mas ainda há uma lacuna na literatura científica em relação a estudos que analisem a influência da microbiota de BIF e o perfil sérico de ácidos graxos, pois grande parte dos estudos é associado a ingestão de FAs e não são contabilizados seus níveis séricos.<sup>4,8,70,71</sup>

Em nosso estudo, foi encontrada associação entre a microbiota de bifidobactérias e os ácidos graxos: palmitoleico (C16:1), linoleico (C18:2) e linolênico+oleico (C18:3 + C18:1), entre os grupos alta/moderada concentração de BIF e baixa concentração de BIF, nessas crianças do Sertão baiano.

Foi demonstrando que há uma influência do POA na microbiota de BIF e vice-versa, afinal, maiores valores de concentração de BIF foram associados a maiores picos cromatográficos de POA, ou seja, maior concentração deste ácido. A associação encontrada entre o ácido palmitoleico (POA) e a microbiota de bifidobactérias já foi relatada. Um estudo relatou maiores proporções de ácido palmitoleico, oleico e outros MUFAs em tecidos de galinhas suplementadas com *Bifidobacterium bifidum*, entretanto nesse trabalho os resultados encontrados foram com suplementação de BIF associada a mananoligossacarídeo (MOS), o que pode ser um fator confundidor de sua análise.<sup>72</sup>

Além desse estudo, outros trazem que a ingesta de alimentos ricos em de POA aumenta crescimento e abundância de bactérias do gênero *Ackermansia* na microbiota intestinal.<sup>73</sup> Reforçando a relação bidirecional entre a presença do ácido e a microbiota.

O ácido palmitoleico ainda tem resultados inconsistentes em relação a seu efeito metabólico, alguns estudos trazem que ele tem potencial de controlar níveis de colesterol e triglicérides, já outros, trazem que sua abundância está relacionada à aumento de risco cardiovascular, com elevação de colesterol total e frações. Contudo, a maioria dos investigadores acredita no seu potencial benéfico, considerando-o como uma das principais intervenções para melhora de perfil lipídico sérico.<sup>8,54,55</sup> Por sua íntima relação com as bifidobactérias, a microbiota se torna também alvo de intervenções, a partir do momento em que o aumento da concentração de BIF fecal leva a elevação desse ácido no sangue.

Segundo alguns estudos, as bifidobactérias são as principais produtoras de ácido linoleico conjugado, um grupo de isômeros posicionais e geométricos do ácido linoleico.<sup>52,74,75</sup> Sendo ele o PUFA mais importante na dieta humana e com alto benefício potencial de redução de risco cardiovascular, sendo um bom regulador da



lipidogênese e dos níveis glicêmicos, reduzindo eventos cardiovasculares e doenças metabólicas.<sup>52,53</sup>

A associação com linolênico foi relatada em neonatos, estudo no qual que foram selecionadas cepas fecais de BIF e testadas suas capacidades de conversão de ácido linolênico em linolênico conjugado (CNLA), demonstrando que essas bactérias têm alta capacidade de transformação desse ácido e posterior produção de CNLA, fazendo com que suas concentrações aumentem no meio.<sup>76</sup>

Sendo atualmente *Bifidobacterium* o gênero mais promissor para produção *in situ* de CNLA, seus altos níveis estão associados a níveis maiores de CNLA e consequentemente altos níveis de linolênico, que é o substrato para sua produção/conversão.<sup>74,75</sup> Sendo ele um ácido, que em níveis elevados, tem provável potencial de reduzir eventos cardiovasculares, diminuindo níveis de colesterol total e frações, acreditando ter efeitos protetores moderados no sistema cardiovascular.<sup>57,58</sup>

Além disso, o ácido linolênico, assim como o linoleico e o araquidônico, fazem parte da família dos PUFAs e já foi relatado em literatura que o aumento desses está associado a maior concentração de bifidobactérias na microbiota intestinal e vice-versa.<sup>39,76</sup>

O ácido oleico é o MUFA mais prevalente na dieta humana, importante constituinte do conteúdo lipídico corporal (ácidos graxos e tecido adiposo) e grande influenciador no sistema cardiovascular, com efeito de melhora no perfil lipídico e metabólico, diminuindo aterosclerose, risco cardiovascular e controlando glicemia por meio da diminuição da resistência à insulina.<sup>8,56</sup>

Em relação á relação ácido oleico/microbiota, os achados em literatura são controversos, já tendo sido associado a maiores níveis de BIF no estudo em que houve reposição do gênero em galinhas, assim como quando feita a suplementação via oral de ácido oleico, por meio do óleo de amendoim, foi observado aumento significativo de quantidade e diversidade das bifidobactérias, mas esse ácido também foi associado a dificuldade de crescimento de cepas de *Bifidobacterium* quando

adicionado ao meio de cultura em comparação com o meio controle que não possuía sua adição.<sup>72,77,78</sup>

É importante pontuar que, no nosso trabalho, o método utilizado na cromatografia não permitiu a separação dos picos referentes aos ácidos linolênico e oleico por possuírem pontos de ebulição muito próximos, sendo representados de forma conjunta, isso pode fazer com que haja viés de confusão quando analisamos a relação de ambos isolados. Contudo, vale ressaltar que ambos os ácidos graxos apresentam um perfil favorável, ao passo que são importantes reguladores do metabolismo lipídico e reduzem risco cardiovascular.

Ainda que esse estudo não tenha encontrado significância estatística relacionada ao ácido esteárico e a concentração de BIF, foi observado um padrão de pacientes com maior concentração de BIF possuem menores picos cromatográficos de ácido esteárico, se relacionando com achados na literatura, como relatado em um estudo feito em animais, no qual menores concentrações de ácido esteárico foram associadas à suplementação com bifidobactérias.<sup>72</sup>

Apesar do achado, o ácido esteárico é relatado como um redutor de LDL e HDL plasmáticos, em contrapartida alguns estudos afirmam sua neutralidade quanto a sua influência no perfil lipídico.<sup>79</sup>

Em relação ao ácido cáprico, também não foram encontrados valores de p significantes, contudo maiores picos cromatográficos desse ácido foram associados a menores concentrações de BIF, o que se correlaciona com a literatura que traz a ocorrência de crescimento dificultado de cepas isoladas de BIF quando adicionado ácido cáprico ao meio.<sup>78</sup> Tendo sua relação bidirecional reforçada por um estudo em infantis que associou o leite materno com níveis elevados de ácido cáprico a aumento da atividade de alguns gêneros bacterianos produtores de SCFAs como: *Bacteroides*, *Enterobacteriaceae*, *Veillonella*, *Streptococcus* e *Clostridium*.<sup>80</sup>

O ácido cáprico em níveis elevados está associado a melhor perfil glicídico, controle da resistência à insulina, melhora de função neurológica, resposta anti-inflamatória e antimetastática, trazendo diversos benefícios ao funcionamento metabólico.<sup>45,46,48</sup>

Em nosso estudo, foi avaliado que pacientes com concentrações de bifidobactérias aumentadas estão associadas a maiores quantidades de ácido palmítico, achado discordante com a literatura que traz que uma suplementação com bifidobactérias resulta uma menor concentração de ácido palmítico no tecido animal.<sup>72</sup>

Sendo o ácido palmítico ligado a eventos cardiovasculares adversos e seu consumo aumentado levando a aumento do RCV, elevação de LDL e HDL plasmáticos, além de ser associado a contribuição para danos cardíacos.<sup>49,51</sup>

A microbiota de BIF tem o poder de alterar quantidades e disponibilidade sérica dos mais diversos ácidos graxos, sendo muitos deles cardioprotetores, reduzindo níveis de LDL, HDL, CT, TG e eventos isquêmicos coronarianos, além de seu efeito na síndrome metabólica, reduzindo a resistência à insulina e diminuindo chance de ocorrência de DM2, sem falar em seus efeitos intestinais, diminuindo eventos inflamatórios sistêmicos e locais, como a colite.<sup>3,5</sup>

Portanto, tanto dietas enriquecidas com os FAs, quanto a suplementação desses ácidos ou de BIF via oral traz efeitos positivos para saúde, isso faz com que sua aplicabilidade clínica seja diversa, desde uma mudança alimentar a medidas medicamentosas, propiciando redução de DCV e modulação do metabolismo.

Importante destacar que o número amostral pode ter limitado algumas associações, contudo não invalida os nossos resultados, uma vez que associações encontradas se ancoram em significância estatística inquestionável, bem como em estudos com resultados semelhantes, fortalecendo assim todo racional biológico proposto para este trabalho.

Por ser observacional, pode sofrer influência de fatores confundidores, situação inerente deste desenho de estudo.

A nosso conhecimento, esse é um dos primeiros estudos que demonstra a relação entre o perfil de ácidos graxos séricos de cadeia média e longa e a concentração fecal de BIF, podemos afirmar que foi encontrado um maior perfil de ácidos graxos não aterogênicos associados a maiores níveis de concentração de BIF, como o que

ocorreu nos ácidos palmitoleico, linoleico e linolênico + oleico, sendo um importante achado que pode dar suporte a outros estudos no sentido de comprovar os benefícios clínicos dessa relação.

## 10 CONCLUSÃO

Os dados deste estudo evidenciam a correlação entre a microbiota de bifidobactérias e o perfil de ácidos graxos plasmáticos, como o linoleico, palmitoleico e linolênico + oleico, o que reforça a hipótese de que há intrínseca influência bidirecional entre essas duas variáveis.

Isso traz de veras relevância clínica, tornando a microbiota e os ácidos graxos alvos terapêuticos, por conta de suas interferências nos mais diversos sistemas, principalmente quando falamos dos seus efeitos cardiovasculares e metabólicos, tornando-os importantes objetos de estudo por suas repercussões sistêmicas na saúde humana. Portanto, esse estudo fomenta a elaboração de mais pesquisas, principalmente no âmbito clínico, capazes de elucidar os efeitos dessa relação entre os ácidos graxos e a microbiota de bifidobactérias no perfil metabólico, cardiovascular e neurológico desses pacientes.

## 11 REFERÊNCIAS

1. Den Besten G, Van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism [Internet]. Vol. 54, *Journal of Lipid Research*. 2013 [citado 13 de abril de 2022]. p. 2325–40. Disponível em: <https://doi.org/10.1194%2Fjlr.R036012>
2. Vellingiri Vadivel, Catherine N Kunyanga, Hans K Biesalski. Health benefits of nut consumption with special reference to body weight control. *Nutrition* [Internet]. 2012 [citado 30 de setembro de 2023];1089–97. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2012.01.004>
3. Briggs MA, Petersen KS, Kris-Etherton PM. Saturated fatty acids and cardiovascular disease: Replacements for saturated fat to reduce cardiovascular risk [Internet]. Vol. 5, *Healthcare (Switzerland)*. MDPI; 2017 [citado 30 de setembro de 2023]. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/healthcare5020029>
4. Yamamura R, Nakamura K, Kitada N, Aizawa T, Shimizu Y, Nakamura K, et al. Associations of gut microbiota, dietary intake, and serum short-chain fatty acids with

fecal short-chain fatty acids. [citado 31 de agosto de 2022]; Disponível em: <https://doi.org/10.12938%2Fbmfh.19-010>

5. Wall R, Ross RP, Shanahan F, O'Mahony L, Kiely B, Quigley E, et al. Impact of administered bifidobacterium on murine host fatty acid composition. *Lipids* [Internet]. maio de 2010 [citado 30 de setembro de 2023];45(5):429–36. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11745-010-3410-7>
6. Nogal A, Valdes AM, Menni C. The role of short-chain fatty acids in the interplay between gut microbiota and diet in cardio-metabolic health [Internet]. Vol. 13, *Gut Microbes*. Bellwether Publishing, Ltd.; 2021 [citado 13 de abril de 2022]. p. 1–24. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1897212>
7. de la Cuesta-Zuluaga J, Mueller NT, Álvarez-Quintero R, Velásquez-Mejía EP, Sierra JA, Corrales-Agudelo V, et al. Higher fecal short-chain fatty acid levels are associated with gut microbiome dysbiosis, obesity, hypertension and cardiometabolic disease risk factors. *Nutrients* [Internet]. 1º de janeiro de 2019 [citado 31 de agosto de 2022];11(1). Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu11010051>
8. Shramko VS, Polonskaya Y V., Kashtanova E V., Stakhneva EM, Ragino YI. The short overview on the relevance of fatty acids for human cardiovascular disorders. *Biomolecules* [Internet]. 1º de agosto de 2020 [citado 9 de outubro de 2023];10(8):1–24. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biom10081127>
9. Tojo R, Suárez A, Clemente MG, De Los Reyes-Gavilán CG, Margolles A, Gueimonde M, et al. Intestinal microbiota in health and disease: Role of bifidobacteria in gut homeostasis [Internet]. Vol. 20, *World Journal of Gastroenterology*. WJG Press; 2014 [citado 16 de outubro de 2022]. p. 15163–76. Disponível em: <https://doi.org/10.3748%2Fwjg.v20.i41.15163>
10. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: An integrative view [Internet]. Vol. 148, *Cell*. Elsevier B.V.; 2012 [citado 16 de outubro de 2022]. p. 1258–70. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.035>
11. Korecka A, Arulampalam V. The gut microbiome: Scourge, sentinel or spectator? *J Oral Microbiol* [Internet]. 2012 [citado 4 de setembro de 2022];4(2012). Disponível em: <https://doi.org/10.3402%2Fjom.v4i0.9367>
12. Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISME Journal* [Internet]. 2007 [citado 13 de setembro de 2022];1(1):56–66. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.3>

13. Schoeler M, Caesar R. Dietary lipids, gut microbiota and lipid metabolism [Internet]. Vol. 20, Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders. Springer; 2019 [citado 12 de abril de 2022]. p. 461–72. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11154-019-09512-0>
14. de Vos WM, Tilg H, Van Hul M, Cani PD. Gut microbiome and health: mechanistic insights [Internet]. Vol. 71, Gut. NLM (Medline); 2022 [citado 4 de setembro de 2022]. p. 1020–32. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-326789>
15. Layden BT, Yalamanchi SK, Wolever TMS, Dunaif A, Lowe WL. Negative association of acetate with visceral adipose tissue and insulin levels. Diabetes Metab Syndr Obes [Internet]. 2012 [citado 16 de outubro de 2022];5:49–55. Disponível em: <https://doi.org/10.2147%2FDMSO.S29244>
16. Bä F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice [Internet]. 2007 [citado 13 de setembro de 2022]. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0605374104>
17. Gomaa EZ. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review [Internet]. Vol. 113, Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2020 [citado 4 de abril de 2023]. p. 2019–40. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01474-7>
18. Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM, Akkermans ADL. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. Appl Environ Microbiol [Internet]. 2002 [citado 2 de abril de 2023];68(1):219–26. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/aem.68.1.219-226.2002>
19. Hill JE, Ursula Fernando WM, Zello GA, Tyler RT, Dahl WJ, Van Kessel AG. Improvement of the Representation of Bifidobacteria in Fecal Microbiota Metagenomic Libraries by Application of the cpn60 Universal Primer Cocktail. Appl Environ Microbiol [Internet]. julho de 2010 [citado 6 de março de 2023];76(13):4550–2. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/aem.01510-09>
20. Turrone F, Foroni E, Pizzetti P, Giubellini V, Ribbera A, Merusi P, et al. Exploring the diversity of the bifidobacterial population in the human intestinal tract. Appl Environ Microbiol [Internet]. março de 2009 [citado 3 de março de 2023];75(6):1534–45. Disponível em: <https://doi.org/10.1128%2FAEM.02216-08>
21. Gibson Y, Roberfroid MB. Dietary Modulation of the Human Colonie Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics [Internet]. Vol. 125, J. Nutr. 1995 [citado 4 de abril de 2023]. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>

22. Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* [Internet]. 27 de janeiro de 2011 [citado 4 de abril de 2023];469(7331):543–9. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature09646>
23. Solopova A, Bottacini F, Venturi degli Esposti E, Amaretti A, Raimondi S, Rossi M, et al. Riboflavin Biosynthesis and Overproduction by a Derivative of the Human Gut Commensal *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697. *Front Microbiol* [Internet]. 15 de setembro de 2020 [citado 1º de março de 2023];11. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.573335>
24. Sonnenburg JL, Chen CTL, Gordon JI. Genomic and metabolic studies of the impact of probiotics on a model gut symbiont and host. *PLoS Biol* [Internet]. 2006 [citado 4 de abril de 2023];4(12):2213–26. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040413>
25. Hidalgo-Cantabrana C, Delgado S, Ruiz L, Ruas-Madiedo P, Sánchez B, Margolles A. Bifidobacteria and Their Health-Promoting Effects. *Microbiol Spectr* [Internet]. 19 de maio de 2017 [citado 1º de abril de 2023];5(3). Disponível em: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.bad-0010-2016>
26. O’Callaghan A, van Sinderen D. Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota [Internet]. Vol. 7, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2016 [citado 31 de março de 2023]. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00925>
27. Kelly SM, Munoz-Munoz J, van Sinderen D. Plant Glycan Metabolism by Bifidobacteria [Internet]. Vol. 12, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2021 [citado 2 de abril de 2023]. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.609418>
28. Okada T, Fukuda S, Hase K, Nishiumi S, Izumi Y, Yoshida M, et al. Microbiota-derived lactate accelerates colon epithelial cell turnover in starvation-refed mice. *Nat Commun* [Internet]. 2013 [citado 31 de março de 2023];4. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncomms2668>
29. Rivière A, Selak M, Lantin D, Leroy F, De Vuyst L. Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: Importance and strategies for their stimulation in the human gut [Internet]. Vol. 7, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Research Foundation; 2016 [citado 4 de abril de 2023]. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00979>
30. Kaliannan K, Wang B, Li XY, Kim KJ, Kang JX. A host-microbiome interaction mediates the opposing effects of omega-6 and omega-3 fatty acids on metabolic endotoxemia. *Sci Rep* [Internet]. 11 de junho de 2015 [citado 8 de outubro de 2023];5. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep11276>

31. Cao W, Wang C, Chin Y, Chen X, Gao Y, Yuan S, et al. DHA-phospholipids (DHA-PL) and EPA-phospholipids (EPA-PL) prevent intestinal dysfunction induced by chronic stress. *Food Funct* [Internet]. 1º de janeiro de 2019 [citado 6 de outubro de 2023];10(1):277–88. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c8fo01404c>
32. Ouwehand AC, Isolauri E, Hashimoto H, Benno Y, Salminen S. Comparison of mucosal adhesion and species identification of bifidobacteria isolated from healthy and allergic infants [Internet]. [citado 4 de abril de 2023]. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2001.tb01548.x>
33. Gueimonde M, Ouwehand A, Huhtinen H, Salminen E, Salminen S. Qualitative and quantitative analyses of the bifidobacterial microbiota in the colonic mucosa of patients with colorectal cancer, diverticulitis and inflammatory bowel disease RAPID COMMUNICATION. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2007 [citado 4 de abril de 2023];13(29):3985–9. Disponível em: <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i29.3985>
34. Sanz Y, Sánchez E, Marzotto M, Calabuig M, Torriani S, Dellaglio F. Differences in faecal bacterial communities in coeliac and healthy children as detected by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Immunol Med Microbiol* [Internet]. dezembro de 2007 [citado 4 de abril de 2023];51(3):562–8. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.2007.00337.x>
35. Lirussi F, Mastropasqua E, Orando S, Orlando R. Probiotics for non-alcoholic fatty liver disease and/or steatohepatitis [Internet]. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley and Sons Ltd; 2007 [citado 4 de abril de 2023]. Disponível em: <https://doi.org/10.1002%2F14651858.CD005165.pub2>
36. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora [Internet]. [citado 4 de abril de 2023]. Disponível em: <https://doi.org/10.1126%2Fscience.1110591>
37. A A Papamandjaris, D E MacDougall, D E MacDougall, P J Jones. Medium chain fatty acid metabolism and energy expenditure: obesity treatment implications. *Life Sci* [Internet]. 1998 [citado 9 de outubro de 2023];1203–15. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(97\)01143-0](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(97)01143-0)
38. St-Onge MP, Jones PJH. Recent Advances in Nutritional Sciences Physiological Effects of Medium-Chain Triglycerides: Potential Agents in the Prevention of Obesity. *J Nutr* [Internet]. 2018 [citado 3 de outubro de 2023];329–32. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jn/132.3.329>
39. Fu Y, Wang Y, Gao H, Li D, Jiang R, Ge L, et al. Associations among Dietary Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids, the Gut Microbiota, and Intestinal Immunity [Internet]. Vol. 2021, *Mediators of Inflammation*. Hindawi Limited; 2021 [citado 6 de outubro de 2023]. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2021/8879227>



40. Calder PC. Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health [Internet]. Vol. 39, *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. SAGE Publications Inc.; 2015 [citado 6 de outubro de 2023]. p. 18S-32S. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0148607115595980>
41. Morrison DJ, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism [Internet]. Vol. 7, *Gut Microbes*. Taylor and Francis Inc.; 2016 [citado 13 de abril de 2022]. p. 189–200. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1134082>
42. Crouse JR, Gerson CD, DeCarli LM, Lieber CS. Role of acetate in the reduction of plasma free fatty acids produced by ethanol in man. *J Lipid Res* [Internet]. julho de 1968 [citado 16 de outubro de 2022];9(4):509–12. Disponível em: [https://www.jlr.org/article/S0022-2275\(20\)42731-2/pdf](https://www.jlr.org/article/S0022-2275(20)42731-2/pdf)
43. Berni Canani R, Di Costanzo M, Leone L. The epigenetic effects of butyrate: Potential therapeutic implications for clinical practice [Internet]. Vol. 4, *Clinical Epigenetics*. 2012 [citado 16 de outubro de 2022]. Disponível em: <https://doi.org/10.1186%2F1868-7083-4-4>
44. Miyamoto J, Hasegawa S, Kasubuchi M, Ichimura A, Nakajima A, Kimura I. Nutritional signaling via free fatty acid receptors [Internet]. Vol. 17, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2016 [citado 3 de outubro de 2023]. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms17040450>
45. Wang ME, Singh BK, Hsu MC, Huang C, Yen PM, Wu LS, et al. Increasing Dietary Medium-Chain Fatty Acid Ratio Mitigates High-fat Diet-Induced Non-Alcoholic Steatohepatitis by Regulating Autophagy. *Sci Rep* [Internet]. 1º de dezembro de 2017 [citado 8 de outubro de 2023];7(1). Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14376-y>
46. Pain E, Shinhmar S, Williams RSB. Using Dictyostelium to Advance Our Understanding of the Role of Medium Chain Fatty Acids in Health and Disease [Internet]. Vol. 9, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A.; 2021 [citado 6 de outubro de 2023]. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.722066>
47. Du X, Li Q, Tang Z, Yan L, Zhang L, Zheng Q, et al. Alterations of the Gut Microbiome and Fecal Metabolome in Colorectal Cancer: Implication of Intestinal Metabolism for Tumorigenesis. *Front Physiol* [Internet]. 4 de maio de 2022 [citado 6 de outubro de 2023];13. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.854545>
48. Augustin K, Khabbush A, Williams S, Eaton S, Orford M, Cross JH, et al. Mechanisms of action for the medium-chain triglyceride ketogenic diet in

neurological and metabolic disorders [Internet]. Vol. 17, The Lancet Neurology. Lancet Publishing Group; 2018 [citado 6 de outubro de 2023]. p. 84–93. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(17\)30408-8](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(17)30408-8)

49. Wang Y, Qian Y, Fang Q, Zhong P, Li W, Wang L, et al. Saturated palmitic acid induces myocardial inflammatory injuries through direct binding to TLR4 accessory protein MD2. *Nat Commun* [Internet]. 3 de janeiro de 2017 [citado 3 de outubro de 2023];8. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncomms13997>

50. Fattore E, Bosetti C, Brighenti F, Agostoni C, Fattore G. Palm oil and blood lipid-related markers of cardiovascular disease: A systematic review and meta-analysis of dietary intervention trials. *American Journal of Clinical Nutrition* [Internet]. 1º de junho de 2014 [citado 3 de outubro de 2023];99(6):1331–50. Disponível em: <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.081190>

51. Meng H, Matthan NR, Wu D, Li L, Rodríguez-Morató J, Cohen R, et al. Comparison of diets enriched in stearic, oleic, and palmitic acids on inflammation, immune response, cardiometabolic risk factors, and fecal bile acid concentrations in mildly hypercholesterolemic postmenopausal women - Randomized crossover trial. *American Journal of Clinical Nutrition* [Internet]. 1º de agosto de 2019 [citado 4 de outubro de 2023];110(2):305–15. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqz095>

52. Lucatto JN, Brandão SNTG de, Drunkler DA. ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO: ESTRUTURA QUÍMICA, EFEITOS SOBRE A SAÚDE HUMANA E ANÁLISE EM LÁCTEOS. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes* [Internet]. 30 de junho de 2014 [citado 6 de outubro de 2023];69(3):199. Disponível em: <https://doi.org/10.14295/2238-6416.v69i3.282>

53. Marangoni F, Agostoni C, Borghi C, Catapano AL, Cena H, Ghiselli A, et al. Dietary linoleic acid and human health: Focus on cardiovascular and cardiometabolic effects [Internet]. Vol. 292, *Atherosclerosis*. Elsevier Ireland Ltd; 2020 [citado 7 de outubro de 2023]. p. 90–8. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2019.11.018>

54. Okada T, Furuhashi N, Kuromori Y, Miyashita M, Iwata F, Harada K. Plasma palmitoleic acid content and obesity in children. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2005 [citado 5 de outubro de 2023];74:747–50. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ajcn/82.4.747>

55. Ebbesson SOE, Voruganti VS, Higgins PB, Fabsitz RR, Ebbesson LO, Laston S, et al. Fatty acids linked to cardiovascular mortality are associated with risk factors. *Int J Circumpolar Health* [Internet]. 12 de agosto de 2015 [citado 4 de outubro de 2023];74. Disponível em: <https://doi.org/10.3402/ijch.v74.28055>

56. Hlais S, El-Bistami D, El Rahi B, Mattar MA, Obeid OA. Combined fish oil and high oleic sunflower oil supplements neutralize their individual effects on the lipid

- profile of healthy men. *Lipids* [Internet]. setembro de 2013 [citado 5 de outubro de 2023];48(9):853–61. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11745-013-3819-x>
57. Abdelhamid AS, Brown TJ, Brainard JS, Biswas P, Thorpe GC, Moore HJ, et al. Omega-3 fatty acids for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease [Internet]. Vol. 2018, *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley and Sons Ltd; 2018 [citado 7 de outubro de 2023]. Disponível em: <https://doi.org/10.7196/samj.2020.v110i12.14730>
58. Rajaram S. Health benefits of plant-derived  $\alpha$ -linolenic acid. Em: *American Journal of Clinical Nutrition* [Internet]. American Society for Nutrition; 2014 [citado 4 de outubro de 2023]. Disponível em: <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.071514>
59. Hooper L, Martin N, Abdelhamid A, Davey Smith G. Reduction in saturated fat intake for cardiovascular disease [Internet]. Vol. 2015, *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley and Sons Ltd; 2015 [citado 6 de outubro de 2023]. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/14651858.cd011737.pub2>
60. Guasch-Ferré M, Babio N, Martínez-González MA, Corella D, Ros E, Martín-Peláez S, et al. Dietary fat intake and risk of cardiovascular disease and all-cause mortality in a population at high risk of cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition* [Internet]. 1º de dezembro de 2015 [citado 4 de outubro de 2023];102(6):1563–73. Disponível em: <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.116046>
61. Fleissner CK, Huebel N, Abd El-Bary MM, Loh G, Klaus S, Blaut M. Absence of intestinal microbiota does not protect mice from diet-induced obesity. *British Journal of Nutrition* [Internet]. 29 de setembro de 2010 [citado 13 de setembro de 2022];104(6):919–29. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/s0007114510001303>
62. Kovatcheva-Datchary P, Nilsson A, Akrami R, Lee YS, De Vadder F, Arora T, et al. Dietary Fiber-Induced Improvement in Glucose Metabolism Is Associated with Increased Abundance of *Prevotella*. *Cell Metab* [Internet]. 2015 [citado 17 de outubro de 2022];22(6):971–82. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.10.001>
63. Chambers ES, Byrne CS, Morrison DJ, Murphy KG, Preston T, Tedford C, et al. Dietary supplementation with inulin-propionate ester or inulin improves insulin sensitivity in adults with overweight and obesity with distinct effects on the gut microbiota, plasma metabolome and systemic inflammatory responses: a randomised cross-over trial. *Gut* [Internet]. 1º de agosto de 2019 [citado 17 de outubro de 2022];68(8):1430–8. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318424>
64. Esteban-Torres M, Ruiz L, Lugli GA, Ventura M, Margolles A, van Sinderen D. Editorial: Role of Bifidobacteria in Human and Animal Health and Biotechnological Applications [Internet]. Vol. 12, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2021 [citado 31 de março de 2023]. Disponível em: <https://doi.org/10.3389%2Ffmicb.2021.785664>

65. Ewaschuk JB, Walker JW, Diaz H, Madsen KL. Bioproduction of Conjugated Linoleic Acid by Probiotic Bacteria Occurs In Vitro and In Vivo in Mice [Internet]. Vol. 136, J. Nutr. 2006 [citado 6 de outubro de 2023]. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jn/136.6.1483>
66. Hertli S, Zimmermann P. Molecular interactions between the intestinal microbiota and the host. Mol Microbiol [Internet]. 1º de junho de 2022 [citado 6 de outubro de 2023];117(6):1297–307. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mmi.14905>
67. Ostermann AI, Müller M, Willenberg I, Schebb NH. Determining the fatty acid composition in plasma and tissues as fatty acid methyl esters using gas chromatography - a comparison of different derivatization and extraction procedures. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids [Internet]. 1º de dezembro de 2014 [citado 8 de outubro de 2023];91(6):235–41. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2014.10.002>
68. Santos OO, Montanher PF, Bonafé EG, Do Prado IN, Maruyama SA, Matsushita M, et al. A simple, fast and efficient method for transesterification of fatty acids in foods assisted by ultrasound energy. J Braz Chem Soc [Internet]. 1º de setembro de 2014 [citado 8 de outubro de 2023];25(9):1712–9. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20140166>
69. Albesiano E, Messmer BT, Damle RN, Allen SL, Rai KR, Chiorazzi N. Activation-induced cytidine deaminase in chronic lymphocytic leukemia B cells: Expression as multiple forms in a dynamic, variably sized fraction of the clone. Blood [Internet]. 1º de novembro de 2003 [citado 5 de maio de 2023];102(9):3333–9. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1585>
70. De Carvalho CCCR, Caramujo MJ. The various roles of fatty acids. Vol. 23, Molecules. MDPI AG; 2018.
71. Dalile B, Van Oudenhove L, Vervliet B, Verbeke K. The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. Vol. 16, Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology. Nature Publishing Group; 2019. p. 461–78.
72. Dev K, Begum J, Biswas A, Mir NA, Singh J, Prakash R, et al. Hepatic transcriptome analysis reveals altered lipid metabolism and consequent health indices in chicken supplemented with dietary Bifidobacterium bifidum and mannan-oligosaccharides. Sci Rep [Internet]. 1º de dezembro de 2021 [citado 7 de outubro de 2023];11(1). Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97467-1>
73. Chen Y, Mai Q, Chen Z, Lin T, Cai Y, Han J, et al. Dietary palmitoleic acid reprograms gut microbiota and improves biological therapy against colitis. Gut

Microbes [Internet]. 2023 [citado 7 de outubro de 2023];15(1). Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2211501>

74. O'Shea EF, Cotter PD, Stanton C, Ross RP, Hill C. Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: Bacteriocins and conjugated linoleic acid. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 16 de janeiro de 2012 [citado 6 de outubro de 2023];152(3):189–205. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.025>

75. Villar-Tajadura MA, Rodríguez-Alcalá LM, Martín V, Gómez De Segura A, Rodríguez JM, Requena T, et al. Production of conjugated linoleic and conjugated  $\alpha$ -linolenic acid in a reconstituted skim milk-based medium by bifidobacterial strains isolated from human breast milk. *Biomed Res Int* [Internet]. 2014 [citado 7 de outubro de 2023];2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2014/725406>

76. Yang B, Chen H, Stanton C, Chen YQ, Zhang H, Chen W. Mining bifidobacteria from the neonatal gastrointestinal tract for conjugated linolenic acid production. *Bioengineered* [Internet]. 4 de maio de 2017 [citado 7 de outubro de 2023];8(3):232–8. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21655979.2016.1222996>

77. Zhao Z, Shi A, Wang Q, Zhou J. High oleic acid peanut oil and extra virgin olive oil supplementation attenuate metabolic syndrome in rats by modulating the gut microbiota. *Nutrients* [Internet]. 1º de dezembro de 2019 [citado 7 de outubro de 2023];11(12). Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu11123005>

78. Perez-Burillo S, Rajakaruna S, Paliy O. Growth of *Bifidobacterium* species is inhibited by free fatty acids and bile salts but not by glycerides. *AIMS Microbiol* [Internet]. 2022 [citado 8 de outubro de 2023];8(1):53–60. Disponível em: <https://doi.org/10.3934/microbiol.2022005>

79. Meng H, Matthan NR, Wu D, Li L, Rodríguez-Morató J, Cohen R, et al. Comparison of diets enriched in stearic, oleic, and palmitic acids on inflammation, immune response, cardiometabolic risk factors, and fecal bile acid concentrations in mildly hypercholesterolemic postmenopausal women - Randomized crossover trial. *American Journal of Clinical Nutrition* [Internet]. 1º de agosto de 2019 [citado 2 de outubro de 2023];110(2):305–15. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqz095>

80. Jiang T, Liu B, Li J, Dong X, Lin M, Zhang M, et al. Association between sn-2 fatty acid profiles of breast milk and development of the infant intestinal microbiome. *Food Funct* [Internet]. 1º de fevereiro de 2018 [citado 7 de outubro de 2023];9(2):1028–37. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c7fo00088j>

## 12 ANEXOS

### 12.1 Anexo A – Ficha de avaliação clínica padrão

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO				
CÓDIGO:			RESPONSÁVEL:	DATA ATENDIMENTO:
SEXO:	DATA DE NASCIMENTO:	IDADE:	MUNICÍPIO:	TELEFONE CONTATO:
ESCOLARIDADE:		ESCOLA:		ZONAR URBANA/RURAL:
DADOS CLÍNICOS E FAMILIARES				
1 – Tipo de parto: ( ) Normal ( ) Cesariana				
2 – Aleitamento materno: ( ) Presente ( ) Ausente				
3 – Tempo de aleitamento materno exclusivo: ( ) < 6 meses ( ) > 6 meses				
4 – Introdução de leite de vaca na alimentação complementar: ( ) < 6 meses ( ) > 6 meses				
5 – Uso de antibióticos antes dos 5 primeiros anos de vida: ( ) Sim ( ) Não				
6 – História familiar de obesidade: ( ) Sim ( ) Não Quem? _____				
7 – História familiar de hipertensão: ( ) Sim ( ) Não Quem? _____				
8 – Uso de medicamentos: ( ) Sim ( ) Não Tempo? _____				
9 – Apresentação de sintomas clínicos: ( ) Sim ( ) Não				
DADOS ANTROPOMÉTRICOS				
INDICADOR	DATA: ____/____/____	DATA: ____/____/____	DATA: ____/____/____	
Estatura (cm)				
Peso (Kg)				
Circunferência da cintura (cm)				
TA (mmHg)				
TA (mmHg)				
TA (mmHg)				

## 12.2 Anexo B – Parecer consubstanciado do CEP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DE UM PROJETO DE INTERVENÇÃO NA MERENDA ESCOLAR SOBRE A SAÚDE DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES NO SERTÃO DA BAHIA

**Pesquisador:** ANA MARICE TEXEIRA LADEIA

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 91282318.3.0000.5544

**Instituição Proponente:** Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências

**Patrocinador Principal:** MUNICIPIO DE SERRINHA

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.962.623

#### Apresentação do Projeto:

Pesquisa será realizada com crianças e adolescentes matriculados nos diversos níveis educacionais em escolas municipais em quatro municípios do Sertão da Bahia. Serão investigados 1500 participantes para avaliação antropométrica e 350 para avaliação laboratorial, devendo ser randomizadas escolas a serem estudadas, respeitando igual proporção entre alunos da zona rural e urbana, com objetivo de avaliar o impacto da redução de consumo de derivados animais e aumento de frutas, verduras, grãos integrais e leguminosas na Merenda Escolar nesses quatro municípios.

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o impacto da redução de consumo de derivados animais e aumento de frutas, verduras, grãos integrais e leguminosas na Merenda Escolar de quatro municípios do Sertão da Bahia sobre a saúde dos estudantes, avaliando-os antropometricamente, clinicamente e laboratorialmente.

Objetivo Secundário:

- Realizar diagnóstico nutricional desta população (desnutrição ou sobrepeso/obesidade);
- Conhecer hábitos alimentares da população estudada e avaliar mudanças ao longo da intervenção proposta pelo MP sobre estes hábitos na população estudada;

**Endereço:** AVENIDA DOM JOÃO VI, 275  
**Bairro:** BROTAS **CEP:** 40.290-000  
**UF:** BA **Município:** SALVADOR  
**Telefone:** (71)3276-8225 **E-mail:** cep@bahiana.edu.br



Continuação do Parecer: 2.962.623

- c) Avaliar impacto da intervenção sobre níveis séricos de micronutrientes tais como ferro, vitamina B12 e vitamina D, além de perfil lipídico;
- d) Quantificar o consumo médio dos macronutrientes e sua relação com distúrbios nutricionais;
- e) Avaliar impacto da intervenção sobre perfil de ácidos graxos séricos no início e ao término do tempo do estudo;
- f) Avaliar frequência de hipertensão arterial na população estudada e sua relação com diagnóstico nutricional e hábitos alimentares;
- g) Determinar a microbiota intestinal dos participantes antes e após a intervenção, correlacionando com dados antropométricos e histórico alimentar e de parto

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

mínimos, relacionados às coletas de sangue e desconforto causado pela avaliação clínica e entrevista. Existe um desconforto e risco mínimos ao se submeter à coleta do sangue. Para evitá-los, a coleta será realizada por profissional treinado e supervisionada pelos pesquisadores. Os participantes serão orientados sobre possibilidade de hematomas. Os pesquisadores se comprometem a prestar assistência em caso de mal estar durante a coleta ou infecção no local da coleta. A coleta será também acompanhada por Dra. Renata Lago (médica pesquisadora) que orientará como evitar hematomas e infecções. Caso aconteçam problemas mais graves, os pesquisadores irão acompanhar o participante à Unidade de Pronto Atendimento para que possam receber tratamento adequado (hidratação venosa ou tratamento de possíveis infecções relacionadas à punção venosa com uso de antibióticos tópicos ou sistêmicos. Durante a obtenção do Consentimento Livre e Esclarecido e/ou Assentimento, serão esclarecidos os procedimentos (entrevista, exame clínico e coleta de amostra biológica) a fim de que aqueles que se sintam desconfortáveis com quaisquer dos procedimentos ( aferição de peso, medida da cintura ou coleta de sangue, por exemplo) sejam excluídos. Em caso de mal-estar ou complicações associados à coleta, os pesquisadores se comprometem a prestar a assistência necessária, conforme descrito no TCLE.

**Benefícios:**

As crianças e adolescentes dos municípios passarão a receber uma merenda escolar mais saudável, que constitui prevenção primordial de doenças no futuro. Caso a avaliação clínica e/ou laboratorial do participante seja normal, está confirmada suas boas condições de saúde. Caso estejam alterados, os exames serão avaliados e seu filho será tratado pela equipe de

<b>Endereço:</b> AVENIDA DOM JOÃO VI, 275	<b>CEP:</b> 40.290-000
<b>Bairro:</b> BROTAS	
<b>UF:</b> BA	<b>Município:</b> SALVADOR
<b>Telefone:</b> (71)3276-8225	<b>E-mail:</b> cep@bahiana.edu.br





Continuação do Parecer: 2.962.623

pesquisadores. Ressaltamos que qualquer patologia diagnosticada durante a pesquisa será avaliada e tratada pela equipe dos pesquisadores, além de encaminhamento para Centros de Referência (Centro de referência Estadual em Endocrinologia e Diabetes – CEDEBA- ou Ambulatório Docente Assistencial da Bahiana - ADAB), onde os pesquisadores atuam.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de um estudo longitudinal intervencionista prospectivo não controlado a ser realizado em crianças e adolescentes matriculados nos diversos níveis educacionais em escolas municipais em quatro municípios do Sertão da Bahia. Considerando-se o número de 35000 alunos nos municípios estudados, foi realizado um cálculo amostral, com auxílio da calculadora eletrônica “Win Pepi”. Para um intervalo de confiança de 95%, estabeleceu-se um n de 1500 participantes para avaliação antropométrica. Dentre o total de participantes, será randomizada uma sub-amostra de 350 participantes a serem submetidos também a avaliação laboratorial. Serão randomizadas escolas a serem estudadas, respeitando igual proporção entre alunos da zona rural e urbana. Todos os educandos selecionados randomicamente (n=1500) serão avaliados nos aspectos clínicos e antropométricos pela equipe envolvida no estudo durante dois anos. Do mesmo modo, a sub-amostra será também submetido a três coletas no período do estudo. Será solicitado às escolas que reservem sala(s) de aula exclusivamente para obtenção dos dados, garantindo privacidade para a entrevista e avaliações propostas e também para coleta de exames laboratoriais. Existe um desconforto e risco mínimos ao se submeter à coleta do sangue. Para evitá-los, a coleta será realizada por profissional treinado e supervisionada pelos pesquisadores. Os participantes serão orientados sobre possibilidade de hematomas. Os pesquisadores se comprometem a prestar assistência em caso de mal estar durante a coleta ou infecção no local da coleta. A coleta será também acompanhada pelos pesquisadores que orientarão como evitar hematomas e infecções. Em caso de intercorrências, os pesquisadores irão acompanhar o participante à Unidade de Pronto Atendimento para que possam receber tratamento adequado. Serão avaliados peso, estatura, circunferência do braço e da cintura, medida das dobras cutâneas, pressão arterial e calculado o índice de massa corporal (peso em kg/altura<sup>2</sup> em metros) e serão classificados de acordo com as curvas de crescimento infantil da Organização Mundial de Saúde (OMS) por meio de software WHO Antrho e Antrho plus (versão 3.2.2). Atividade física será mensurada através do Questionário e Atividade Física em crianças maiores (PAQ-C), validado para o Brasil em sua versão curta. Estes questionários serão aplicados no momento da inclusão no estudo e repetidas mais duas vezes com frequência semestral. Foram adicionadas três questões relacionadas a atividade física correlacionada a trabalhos manuais, conforme preconizado por

**Endereço:** AVENIDA DOM JOÃO VI, 275

**Bairro:** BROTAS

**UF:** BA

**Telefone:** (71)3276-8225

**Município:** SALVADOR

**CEP:** 40.290-000

**E-mail:** cep@bahiana.edu.br



Continuação do Parecer: 2.962.623

Almeida em 2011. O consumo alimentar será avaliado por meio de Recordatório Alimentar de 24 horas (R24h) associado ao Questionário Frequência Alimentar (QFA), em apêndice, a serem aplicados pelos pesquisadores nos pais ou responsáveis pelos escolares. Nos participantes randomizados para a sub-amostra (n=350), serão coletados sangue venoso e fezes a fim de realizar exames complementares (hemograma, ferritina, glicemia de jejum, colesterol total e frações, triglicérides, vitamina B12 e 25 OH vitamina D3) e análise de microbiota fecal. As coletas serão repetidas a cada semestre (total de três avaliações). Será coletado aproximadamente 10 ml da veia cubital ou radial das crianças e adolescentes após jejum (8h). As amostras serão coletadas por um Laboratório de Análises Clínicas sediado em Serrinha, segundo procedimentos padrão de segurança, onde também serão processadas. Os pesquisadores realizarão o transporte das amostras em recipientes térmicos adequados para posterior análise por um Laboratório de referência em Salvador. Durante todo o período do estudo, as amostras serão armazenadas em freezer -80° C na Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP), que se responsabilizará pelo descarte das mesmas ao final do Estudo. Os pesquisadores se comprometem a manter sob sua guarda sigilosa os instrumentos de coleta durante e após a realização da pesquisa na EBMSP sob responsabilidade da Coordenadora.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

- Folha de rosto apresentada com adequação.
- Documento de anuência: apresentados, assinados por todas as prefeituras envolvidas.
- Cronograma: ajustado
- Metodologia: adequada
- Riscos e benefícios: adequados.
- TCLE e Termos de assentimento: adequados

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Após a análise bioética deste protocolo, de acordo com a resolução 466/12 do CNS e documentos afins, a partir das resposta de pendências ao parecer consubstanciado datado de 17 de setembro de 2018, consideramos APROVAÇÃO.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Atenção : o não cumprimento à Res. 466/12 do CNS abaixo transcrita implicará na impossibilidade de avaliação de novos projetos deste pesquisador.

**XI DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL**

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os

<b>Endereço:</b> AVENIDA DOM JOÃO VI, 275	<b>CEP:</b> 40.290-000
<b>Bairro:</b> BROTAS	
<b>UF:</b> BA	<b>Município:</b> SALVADOR
<b>Telefone:</b> (71)3276-8225	<b>E-mail:</b> cep@bahiana.edu.br



Continuação do Parecer: 2.962.623

aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador: a) e b) (...)

c) desenvolver o projeto conforme delineado;

d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;

e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento;

f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa;

g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e

h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1150270.pdf	18/09/2018 22:24:58		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	assentimento_ES.doc	18/09/2018 22:20:30	RENATA MARIA RABELLO DA SILVA LAGO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	assentimento_ES_sem_coleta.doc	18/09/2018 22:20:00	RENATA MARIA RABELLO DA SILVA LAGO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ES_sem_coleta.doc	18/09/2018 22:19:43	RENATA MARIA RABELLO DA SILVA LAGO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ES.doc	18/09/2018 22:19:19	RENATA MARIA RABELLO DA SILVA LAGO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_versao_final_CEP.pdf	18/09/2018 22:18:49	RENATA MARIA RABELLO DA SILVA LAGO	Aceito
Outros	carta_ao_CEP_versao_2.docx	18/09/2018 22:15:56	RENATA MARIA RABELLO DA SILVA LAGO	Aceito
Outros	carta_ao_CEP.docx	12/07/2018 20:31:16	ANA MARICE TEXEIRA LADEIA	Aceito

**Endereço:** AVENIDA DOM JOÃO VI, 275

**Bairro:** BROTAS

**CEP:** 40.290-000

**UF:** BA

**Município:** SALVADOR

**Telefone:** (71)3276-8225

**E-mail:** cep@bahiana.edu.br



Continuação do Parecer: 2.962.623

Folha de Rosto	folha_de_rosto_ES.pdf	12/06/2018 10:00:52	ANA MARICE TEXEIRA LADEIA	Aceito
Outros	TAC_Biringa.pdf	04/06/2018 10:09:02	ANA MARICE TEXEIRA LADEIA	Aceito
Outros	TAC_Teofilandia.pdf	04/06/2018 10:08:07	ANA MARICE TEXEIRA LADEIA	Aceito
Outros	TAC_Barrocas.pdf	04/06/2018 10:06:09	ANA MARICE TEXEIRA LADEIA	Aceito
Outros	TAC_Serrinha.pdf	04/06/2018 10:05:01	ANA MARICE TEXEIRA LADEIA	Aceito
Outros	INSTRUMENTO_DE_COLETA.docx	04/06/2018 07:32:19	ANA MARICE TEXEIRA LADEIA	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SALVADOR, 15 de Outubro de 2018

---

**Assinado por:**  
**Maria Thaís de Andrade Calasans**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** AVENIDA DOM JOÃO VI, 275  
**Bairro:** BROTAS **CEP:** 40.290-000  
**UF:** BA **Município:** SALVADOR  
**Telefone:** (71)3276-8225 **E-mail:** cep@bahiana.edu.br